

**Untersuchungen zur Interaktion von
Bartonella quintana mit THP-1-Makrophagen**

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

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

vorgelegt von

Bennett, geb. Klumpp, Sandra

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. I. B. Autenrieth
2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl
3. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner

**Auch aus Steinen,
die dir in den Weg gelegt werden,
kannst du etwas Schönes bauen.**

Erich Kästner (1899-1974)

**To my husband
Brandon,
who always believes in me.**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Gattung <i>Bartonella</i>	1
1.1.1. Taxonomie und Geschichte	1
1.1.2. Mikrobiologische Charakteristika von <i>Bartonella</i> spp.	1
1.1.3. Klinisches Spektrum humaner <i>Bartonella</i> spp.-Infektionen	2
1.2. Durch <i>Bartonella quintana</i> verursachte Erkrankungen	3
1.2.1. Fünf-Tage-Fieber (Schützengrabenfieber)	5
1.2.2. Lymphadenopathie	5
1.3. Durch <i>Bartonella henselae</i> verursachte Erkrankungen	6
1.3.1. Katzenkratzkrankheit (<i>cat scratch disease</i> , CSD)	6
1.3.2. Weitere durch <i>Bartonella henselae</i> verursachte Erkrankungen	7
1.4. Durch <i>Bartonella henselae</i> und <i>Bartonella quintana</i> verursachte Erkrankungen	8
1.4.1. Bazilläre Angiomatose (BA)	8
1.4.2. Peliosis hepatis (PH)	10
1.4.3. Chronische Bakteriämie	11
1.4.4. Infektiöse Endokarditis	12
1.5. Durch <i>Bartonella bacilliformis</i> verursachte Erkrankungen	13
1.6. Diagnostik	14
1.7. Pathogenität von <i>Bartonella</i> spp.	15
1.7.1. Pathogenität von <i>Bartonella henselae</i>	16
1.7.2. Pathogenität von <i>Bartonella quintana</i>	23

1.8. Angiogenese	25
1.8.1. Physiologische Angiogenese	25
1.8.2. Pathologische Angiogenese	26
1.8.3. Pathologische Angiogenese durch <i>Bartonella</i> spp.	27
1.9. Zytokine	28
1.9.1. Proangiogenetisch wirksame Zytokine	28
1.9.1.1. Das Zytokin <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)	28
1.9.1.2. Regulation der VEGF-Induktion	30
1.9.1.3. Das Zytokin Interleukin-8 (IL-8)	31
1.9.1.4. Regulation der IL-8-Induktion	31
1.10. Makrophagen und bakterielle Infektion	32
1.11. Zielsetzung dieser Arbeit	35
2. Material und Methoden	36
2.1. Material	36
2.1.1. Geräte	36
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	37
2.1.3. Chemikalien	37
2.1.4. Antibiotika	38
2.1.5. Rekombinante Zytokine	38
2.1.6. Antikörper	38
2.1.7. Medien	39
2.1.8. Zelllinien	40
2.1.9. Bakterienstämme	40
2.1.10. ELISA	41
2.1.10.1. VEGF-ELISA	41
2.1.10.2. IL-8-ELISA	41

2.2. Methoden	42
2.2.1. Bakterien	42
2.2.1.1. Herstellung und Kultivierung von Bakterien für <i>in vitro</i> -Experimente	42
2.2.2. Zellkultur und Infektionsexperimente	42
2.2.2.1. Auftauen von THP-1-Zellen	42
2.2.2.2. Kultivierung von THP-1-Zellen	43
2.2.2.3. Bestimmung der Lebendzellzahl	43
2.2.2.4. Infektionsexperimente	44
2.2.3. Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen: ELISA	45
2.2.3.1. Gewinnung von Zellkulturüberständen	45
2.2.3.2. ELISA	46
2.2.3.3. VEGF-ELISA	47
2.2.3.4. IL-8-ELISA	47
2.2.4. Statistik	49
3. Ergebnisse	50
3.1. Adhärenz von <i>Bartonella quintana</i> an THP-1-Makrophagen im Vergleich zu <i>Bartonella henselae</i>	50
3.2. Invasion und intrazelluläre Persistenz in THP-1-Makrophagen von <i>Bartonella quintana</i> im Vergleich zu <i>Bartonella henselae</i>	51
3.3. Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort im Zellkulturmodell durch <i>Bartonella quintana</i> verglichen mit <i>Bartonella henselae</i>	53
3.3.1. Induktion der VEGF-Sekretion in THP-1-Makrophagen durch <i>Bartonella quintana</i>	54

3.3.2. Induktion der IL-8-Sekretion in THP-1-Makrophagen durch <i>Bartonella quintana</i>	55
3.3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	57
4. Diskussion	58
4.1. Pathogenese von <i>Bartonella</i> spp.-induzierten Vaskuloproliferationen: die Rolle von Zytokinen und Makrophagen	59
4.2. Mechanismen der Bakterien-Wirtszell-Interaktion: ein Vergleich zwischen <i>Bartonella quintana</i> und <i>Bartonella henselae</i>	60
4.2.1. Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort durch <i>Bartonella quintana</i>	60
4.2.2. <i>Bartonella quintana</i> zeigt eine deutlich verminderte Adhärenz an THP-1-Zellen im Vergleich zu <i>Bartonella henselae</i>	63
4.2.2.1. Zusammenhang zwischen Wirtszell- adhärenz und Induktion der Zytokin-Sekretion	64
4.2.3. Invasion von <i>Bartonella quintana</i> in THP-1-Makrophagen im Vergleich zu <i>Bartonella henselae</i>	66
4.2.4. Intrazelluläre Persistenz und Proliferation von <i>Bartonella quintana</i> in humanen Makrophagen	68
4.2.5. Interaktion zwischen <i>Bartonella</i> spp. und humanen Makrophagen	72
4.3. Ausblick	73
5. Zusammenfassung	76
6. Literaturverzeichnis	78

7. Abkürzungen**94****8. Publikationen****98****9. Danksagung****99**

1. Einleitung

1.1. Die Gattung *Bartonella*

1.1.1. Taxonomie und Geschichte

Die Gattung *Bartonella* umfasst zur Zeit mehr als 20 verschiedene Spezies und Subspezies, von denen ungefähr 12 als humanpathogen angesehen werden, u. a. *B. henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis*, *B. elizabethae*, *B. clarridgeiae*, *B. vinsonii* und *B. Grahamii* (Lamas, Curi et al. 2008; Minnick and Battisti 2009; Mosepele, Mazo et al. 2012; Kawasato, de Oliveira et al. 2013). Die Identifikation von Spezies der Gattung *Bartonella* als Auslöser der Katzenkratzkrankheit (KKK oder *cat scratch disease*, CSD), der bazillären Angiomatose (BA), der Peliosis hepatis (PH), des Schützengrabenfiebers sowie einer zunehmenden Anzahl an klinischen Manifestationsformen unterstreicht die wachsende Bedeutung des Erregers. Der Großteil humaner Infektionen wird durch drei dieser Spezies - *B. henselae*, *B. quintana* und *B. bacilliformis* – verursacht (Eicher and Dehio 2012; Harms and Dehio 2012). Die durch sie ausgelösten Krankheitsbilder reichen von leichten, lokalen bis hin zu schwersten, systemischen Infektionsverläufen. Bartonellen sind derzeit zudem die einzigen Bakterien, von denen man weiß, dass sie angioproliferative Fähigkeiten besitzen (Hahn 2005).

1.1.2. Mikrobiologische Charakteristika von *Bartonella* spp.

Bei *Bartonella* spp. handelt es sich um gramnegative, fakultativ intrazellulär wachsende Stäbchen. Das Bakterium wurde nach dem peruanischen Bakteriologen Alberto Leonardo Barton benannt und ist phylogenetisch eng mit den Genera *Rickettsia* und *Brucella* verwandt (Hahn 2005). Die Anzucht von *Bartonella* spp. ist in Zellkultur oder auf Schokoladen-, Kochblut- oder Hämingerreichertem Agar möglich. In Flüssigkultur wächst das Bakterium nur unzureichend.

Die besten Wachstumsbedingungen liegen bei 37 °C, 5 % CO₂ und erhöhter Luftfeuchtigkeit vor. Bei Kultivierung auf Blut-Agarplatten sind bei Erstisolaten bis zum Auftreten sichtbarer Kolonien Inkubationszeiten von zwei bis fünf Wochen nötig. Durch weiteres Passagieren lässt sich die Inkubationszeit verkürzen. Die Morphologie der Kolonien ist rau, was auf Pilusexpression zurückzuführen ist. Nach mehrmaligem Passagieren verlieren die Bakterien die Eigenschaft der Pilusexpression, die Morphologie wird glatt. Desweiteren stehen labordiagnostische Methoden wie die Serologie, Histopathologie und der molekularbiologische Nachweis vorrangig aus Lymphknotenbiopsien und Lymphknotenaspiraten zur Verfügung. Zudem gewinnt der DNA-Nachweis aus Blutproben zunehmend an Bedeutung (Kawasato, de Oliveira et al. 2013).

Das Genom von *B. quintana* wurde sequenziert und hat sich als Abkömmling des größeren Genoms von *B. henselae* herausgestellt (Alsmark, Frank et al. 2004; Li, Tong et al. 2012). Der Hauptunterschied zwischen den Spezies besteht im Fehlen einer Genom-Insel im *B. quintana*-Genom (Alsmark, Frank et al. 2004). Sowohl das Genom von *B. quintana* als auch *B. henselae* sind verkürzte Versionen des Chromosom I von *Brucella melitensis*, einem phylogenetisch nah verwandten Bakterium (Alsmark, Frank et al. 2004).

1.1.3. Klinisches Spektrum humaner *Bartonella* spp.-Infektionen

Bartonella spp. ist verantwortlicher Erreger für eine Vielzahl an klinischen Manifestationsformen (**Tab. 1**). Dazu zählen spezifische Krankheitsbilder wie die Katzenkratzkrankheit, das Fünf-Tage-Fieber, die Carrión'sche Krankheit, die bazilläre Angiomatose sowie die Peliosis hepatis (Greub and Raoult 2002). Desweiteren treten aber auch unspezifische Manifestationsformen wie Endokarditis, chronische Bakteriämie, Lymphadenopathie, Osteomyelitis sowie Enzephalitis auf (Greub and Raoult 2002; Maguina, Guerra et al. 2009; Badiaga and Brouqui 2012). Als Zielzellen für den Erreger *Bartonella* kommen neben Erythrozyten und Endothelzellen auch Monozyten und Makrophagen

in Frage (Dehio, Meyer et al. 1997; Kempf, Schairer et al. 2005; Kawasato, de Oliveira et al. 2013). Während immunkompetente Patienten normalerweise milde Krankheitsverläufe zeigen, sind immunkompromittierte Patienten – beispielsweise Patienten mit HIV/AIDS oder nach Organtransplantation – deutlich mehr gefährdet, schwere und auch lebensbedrohliche Krankheitsverläufe zu erleiden. Aus der stetig steigenden Anzahl an Immunkompromittierten ergibt sich auch die wachsende Bedeutung der Gattung *Bartonella* (Mosepele, Mazo et al. 2012).

Tab. 1: *Bartonella* spp.: natürliches Vorkommen, Überträger und Erkrankungen des Menschen

<i>Bartonella</i> spp.	Reservoir	Vektor	Erkrankungen
<i>B. henselae</i>	Katze, Hund, Mensch	Katzenfloh	Katzenkratzkrankheit Bazilläre Angiomatose Peliosis hepatis Endokarditis Neuroretinitis
<i>B. quintana</i>	Mensch	Körperlaus	Wolhynisches Fieber Bazilläre Angiomatose Peliosis hepatis Endokarditis
<i>B. bacilliformis</i>	Mensch	Sandfliege	Carrión-Krankheit: Oroyafieber, Verruga peruana

Quellen: (Hahn 2005; Chomel, Boulouis et al. 2009; Minnick and Battisti 2009)

1.2. Durch *Bartonella quintana* verursachte Erkrankungen

Bartonella quintana ist der Erreger des Fünf-Tage-Fiebers (auch Wolhynisches Fieber und Schützengrabenfieber, engl. *trench fever*), welches erstmalig 1915 beschrieben wurde. Unter den schlechten hygienischen Bedingungen im

Ersten Weltkrieg kam es zu einem epidemischen Auftreten, bei dem mehr als eine Million Soldaten von der Erkrankung betroffen waren (Maurin and Raoult 1996; Ohl and Spach 2000; Foucault, Barrau et al. 2002; Foucault, Brouqui et al. 2006). Nach dem Ersten Weltkrieg fiel die Inzidenz des Fünf-Tage-Fiebers dramatisch ab (Harms and Dehio 2012). Im Zweiten Weltkrieg wurden jedoch erneute Epidemien beschrieben.

Die humane Körperlaus (**Abb. 1**), *Pediculus humanus corporis*, überträgt als Vektor die Erkrankung von Mensch zu Mensch, welcher einziges bekanntes Reservoir ist (Raoult and Roux 1999; Foucault, Barrau et al. 2002; Foucault, Brouqui et al. 2006; Badiaga and Brouqui 2012). Das Bakterium vermehrt sich im Läusedarm und wird durch die Exkremente über Hautverletzungen auf den Menschen übertragen (Raoult and Roux 1999). Die Pediculose (Läusebefall) ist mit schlechten hygienischen Bedingungen, Alkoholismus sowie niedrigem sozioökonomischen Status assoziiert und ist daher insbesondere in der obdachlosen Bevölkerung weiterhin weit verbreitet (Minnick and Battisti 2009; Badiaga and Brouqui 2012). Mit zunehmender Häufigkeit werden bei immunsupprimierten Patienten und Obdachlosen auch Bakteriämien durch *B. quintana* diagnostiziert (Hahn 2005). In Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass *B. quintana* während einer asymptomatischen Bakteriämie in Erythrozyten lokalisiert ist (Rolain, Foucault et al. 2002) und konnte in Erythroblasten im Knochenmark bei bakteriämischen Patienten nachgewiesen werden (Rolain, Foucault et al. 2003). Auch Endokarditiden sowie die vaskuloproliferative bazilläre Angiomatose können durch *B. quintana* ausgelöst werden. Körperläuse sind vermutlich nicht die einzigen Vektoren von *B. quintana*. Das Bakterium wurde auch in Katzenflöhen (Rolain, Franc et al. 2003) und Katzenzahnfleisch (La, Tran-Hung et al. 2005) nachgewiesen sowie bei einem Katzenbesitzer mit einer chronischen Lymphadenopathie (Raoult, Drancourt et al. 1994), was auf einen Übertragungsweg ähnlich dem durch *B. henselae* bei der Katzenkratzkrankheit hindeutet.



Abb. 1: *Pediculus humanus corporis*, die humane Körperlaus, elektronenmikroskopisch in 120-facher Vergrößerung betrachtet (Foucault, Brouqui et al. 2006).

1.2.1. Fünf-Tage-Fieber (Schützengrabenfieber)

Nach Übertragung von *Bartonella quintana* durch die humane Körperlaus beträgt die Inkubationszeit des Fünf-Tage-Fiebers 10-30 Tage. Die Erkrankung zeichnet sich durch plötzlich einsetzende Kopfschmerzen, aseptische Meningitis sowie andere unspezifische Symptome wie prätibialen Schmerz und Gelenkschmerzen aus (Badiaga and Brouqui 2012). Charakteristisch ist zudem meist akut einsetzendes Fieber, das über fünf Tage andauern oder auch alle fünf Tage rezidivieren kann. Die Behandlung erfolgt mit Doxycyclin oder mit Makrolid-Antibiotika, wie Erythromycin und Azithromycin (Ohl and Spach 2000).

1.2.2. Lymphadenopathie

Bartonella quintana kann eine Lymphadenopathie auslösen. Eine 30-jährige Frau mit isolierter chronischer, afebriler, zervikaler und mediastinaler

Lymphadenopathie war die erste Patientin, über die berichtet wurde (Rolain, Brouqui et al. 2004).

Die histologische Untersuchung eines zervikalen Lymphknotens zeigte eine granulomatöse Reaktion und *B. quintana* konnte aus Blutkulturen isoliert werden. Bei einem zweiten Fall handelte es sich um einen Hämodialyse-Patienten mit Sjögren-Syndrom, der eine mediastinale Lymphadenopathie und sekundäre Panzytopenie aufwies (Koehler, Sanchez et al. 1997). *B. quintana* konnte aus einer Knochenmarksprobe isoliert werden und das Bakterium wurde mit Hilfe molekularbiologischer Methoden identifiziert. Im Serum des Patienten konnte ein erhöhter Antikörpertiter gegen *B. quintana* gemessen werden. 2003 wurde bei einem HIV-infizierten Patienten mit supraklavikulärer entzündlicher Lymphadenitis von einer Koinfektion mit *B. quintana* und *Mykobacterium tuberculosis* berichtet. Die beiden Mikroorganismen wurden aus Lymphknoten isoliert.

1.3. Durch *Bartonella henselae* verursachte Erkrankungen

Bartonella henselae wurde erstmals im Jahr 1990 aus dem Blut einer HIV-infizierten Patientin isoliert und als Ursache von Fieber und Bakteriämien identifiziert. *B. henselae* konnte ferner mit der Entstehung der bazillären Angiomatose, der Peliosis hepatis und weiteren Krankheitsbildern in Verbindung gebracht werden (Welch, Pickett et al. 1992). Der Erreger wurde im Jahr 1992 charakterisiert und zu Ehren der medizinisch-technischen Assistentin Diane Hensel benannt.

1.3.1. Katzenkratzkrankheit (*cat scratch disease*, CSD)

Die Katzenkratzkrankheit (KKK) ist typischerweise eine gutartige, selbstlimitierende Erkrankung, die sich vor allem bei Immunkompetenten, meist Kindern und Jugendlichen, manifestiert (Vilibic-Cavlek, Karlovic-Martinkovic et al. 2012). Sie äußert sich typischerweise in einer lokalisierten Lymphadenopathie, die auch ohne Antibiotikatherapie innerhalb von

sechs bis zwölf Wochen ausheilt (Franz and Kempf 2011; Harms and Dehio 2012). Nach einer Kratz- oder Bissverletzung durch eine Katze bildet sich innerhalb von drei bis fünf Tagen an der Stelle der Hautläsion eine kleine Papel oder Pustel, die nach ein bis zwei Wochen narbenlos ausheilt. Ihr folgt nach zwei bis drei Wochen eine regionäre Lymphadenopathie, meist axillär, supraklavikulär oder cervikal. Die Lymphknoten sind vergrößert und weich, aber selten schmerzhaft. Normalerweise bilden sie sich über eine Zeitspanne von Monaten bis Jahren zurück. In 10 % der Fälle kommt es allerdings zu einer Abszedierung. Ungefähr die Hälfte der Patienten entwickelt zusätzlich grippeartige Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen und Unwohlsein. Desweiteren kann es zu Übelkeit, Gewichtsverlust, Halsschmerzen und Splenomegalie kommen. Histologisch zeigt sich die Katzenkratzkrankheit in den entnommenen Lymphknoten als eine nekrotisierende, granulomatöse Entzündungsreaktion mit lymphatischen Infiltraten und mehrkernigen Riesenzellen. In 10 % der Fälle kommt es zu schwerwiegenden Komplikationen, die sehr vielfältig sein können. Die häufigste Komplikation stellt das Parinaud'sche okkulo-oglanduläre Syndrom dar, das sich als nichteitrige Konjunktivitis mit präaurikulärer Lymphadenopathie manifestiert. Weitere atypische Manifestationen sind die Enzephalitis, zerebrale Arteriitis, Radikulitis, Myelitis, granulomatöse Hepatitis, Splenitis, atypische Pneumonie, hiläre Adenopathie, Pleuraerguss, Osteomyelitis, Erythema nodosum, Erythema annulare und Parotisschwellung. Bei der komplikationslos verlaufenden KKK genügt in der Regel eine konservative symptomatische Therapie. Der Einsatz von Antibiotika ist meist nur bei Auftreten von Komplikationen indiziert. Hierbei erzielt Azithromycin – für fünf Tage verabreicht – die besten Resultate.

1.3.2. Weitere durch *Bartonella henselae* verursachte Erkrankungen

Selten treten neurologische Manifestationen auf, wie beispielsweise eine Enzephalitis oder Neuroretinitis (Harms and Dehio 2012). Bei Immunsupprimierten disseminieren *B. henselae*-Infektionen häufiger und

können zu Abszessen sowie Leber- und Lungengranulomen führen (Hahn 2005).

1.4. Durch *Bartonella henselae* und *Bartonella quintana* verursachte Erkrankungen

1.4.1. Bazilläre Angiomatose (BA)

Bei der bazillären Angiomatose (BA) handelt es sich um eine vaskuloproliferative Erkrankung, die hauptsächlich bei Immunsupprimierten, insbesondere AIDS-Patienten oder Patienten unter medikamentöser Immunsuppression beispielsweise nach Organtransplantation, auftritt (Maurin and Raoult 1996; Koehler, Sanchez et al. 1997; Koehler, Sanchez et al. 2003; Moulin, Kanitakis et al. 2012). Sie wurde erstmalig im Rahmen der HIV-Epidemie beschrieben (Koehler, Sanchez et al. 1997; Karem, Paddock et al. 2000). In seltenen Fällen können aber auch Immunkompetente an BA erkranken (Tappero, Koehler et al. 1993; Minnick and Battisti 2009).

Sowohl *Bartonella henselae* als auch *Bartonella quintana* konnten als Erreger der bazillären Angiomatose nachgewiesen werden (Raoult and Roux 1999; Foucault, Brouqui et al. 2006). Makroskopisch zeigt sich die BA als kutane oder subkutane derbe, rötlich-livide Papeln, die sich zu Knötchen oder Tumoren entwickeln. Die Läsionen können einzeln oder multipel auftreten und bei Verletzung stark bluten. Mikroskopisch zeigen sich lobuläre, kapilläre Gefäßproliferationen epitheloider, teilweise atypischer Endothelzellen, die Blutgefäße auskleiden und möglicherweise in das Lumen hineinragen. Häufig finden sich entzündliche Infiltrate, die das Pathogen, neutrophile Granulozyten und leukozytoklastischen Debris enthalten (Franz and Kempf 2011) (**Abb. 2**).

Von der parenchymalen bazillären Angiomatose können verschiedenste Organsysteme betroffen sein, wie z.B. Milz, Leber, Lunge, Endokard, Knochenmark, Lymphknoten oder die Mukosa des Gastrointestinaltraktes (Harms and Dehio 2012; Mosepele, Mazo et al. 2012).

Als Therapie kommt in erster Linie die Gabe von Antibiotika in Frage, wobei die Dauer der Therapie vom Immunstatus des Patienten abhängig ist. Sie resultiert in einer kompletten Rückbildung der Vaskuloproliferationen, wobei Rückfälle jedoch häufig sind (Tappero, Koehler et al. 1993; Hahn 2005; Franz and Kempf 2011; Holmes, Opat et al. 2011). Clarithromycin und Azithromycin gelten gegenwärtig als Therapie der ersten Wahl (Rolain, Brouqui et al. 2004). Alternativ kommen auch Erythromycin, Doxycyclin sowie Ciprofloxacin in Frage (Rudikoff, Phelps et al. 1989).

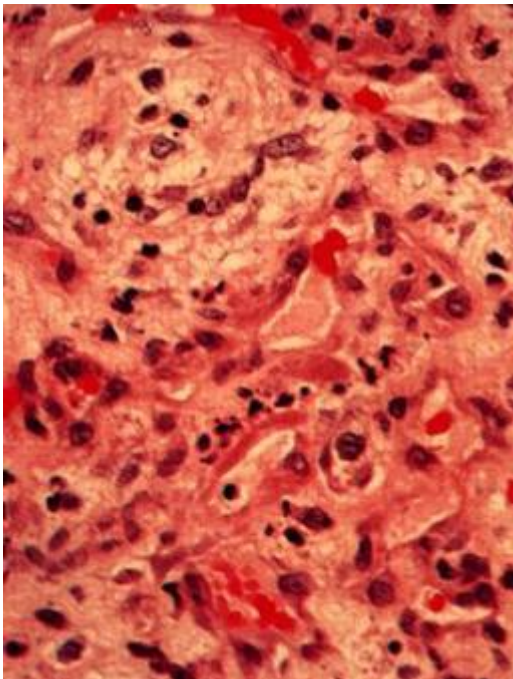
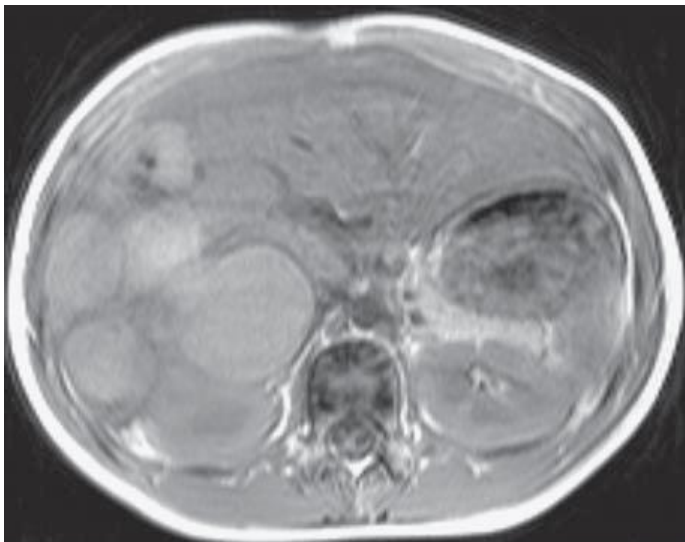


Abb. 2: Gewebeprobe eines Patienten mit bazillärer Angiomatose (BA) und fortgeschrittener HIV-Erkrankung. Man sieht eine Proliferation an plumpen Gefäße in einem ödematösen Stroma mit einer bedeutenden Anzahl an polymorphonukleären Leukozyten. Das an die im Zentrum gelegenen Gefäße angrenzende granulare basophile Material stellt Ansammlungen des Erregers dar (Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 400-facher Vergrößerung) (Maurer 1998).

1.4.2. Peliosis hepatis (PH)

Bei der Peliosis hepatis handelt es sich um eine seltene vaskuloproliferative Erkrankung der Leber, die in erster Linie bei Immunsupprimierten vorkommt. Sie ist gekennzeichnet durch dilatierte Lebersinusoiden und zystisch-gekammerte, blutgefüllte Endothelzell-Proliferationen, die von myxoidem Stroma umgeben sind (**Abb. 3**). Die Läsionen sind charakteristischerweise von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten infiltriert (Cockerell and LeBoit 1990; Manders 1996). Das klinische Bild der Peliosis hepatis ist geprägt von Fieber, Abdominalschmerzen, Gewichtsverlust und Hepatomegalie. Laborchemisch lässt sich eine erhöhte alkalische Phosphatase nachweisen. Vielfach handelt es sich um Patienten mit HIV-Infektion, zu einem geringen Prozentsatz um solche mit fortgeschrittenen Malignomen, Immunsuppression oder nach Gabe von Anabolika.

Sowohl *Bartonella henselae* als auch *Bartonella quintana* gelten heute als Auslöser dieser Erkrankung.



(A)

Abb. 3: Native T1-gewichtete axiale Magnetresonanztomographie (MRT) (A) zeigt multiple gut abgrenzbare hyperintense Raumforderungen (Battal, Kocaoglu et al. 2010).

1.4.3. Chronische Bakteriämie

Die persistierende Bakteriämie wird schon lange mit *Bartonella quintana* und *Bartonella henselae* assoziiert (Byam 1919; Karem, Paddock et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass *B. quintana* im Blut von Patienten mit Schützengrabenfieber bis zu acht Jahre nach der initialen Infektion nachweisbar war (Kostrzewski 1949) (**Abb. 4**). In Studien wurde eine asymptomatische und prolongierte Bakteriämie bei 16 von 42 Patienten mit positiver Blutkultur nachgewiesen (Rolain, Foucault et al. 2002). Die chronische Bakteriämie persistierte für 78 Wochen bei einem dieser Patienten, für 53 und 17 Wochen bei zwei weiteren Patienten. Bei den 13 verbliebenen Patienten blieb die Blutkultur für ein bis acht Wochen positiv. Intermittierende Bakteriämien wurden über Zeiträume von vier bis 58 Wochen beobachtet. Ursächlich konnte beispielsweise der Kontakt mit Tieren sowie Tierbisse und -kratzer mit nachfolgenden unspezifischen Symptomen wie Fatigue, Gelenk- und Muskelschmerzen nachgewiesen werden (Maggi, Mascarelli et al. 2011). Nicht nur immunsupprimierte sondern auch immunkompetente Patienten scheinen von persistierenden Bakteriämien durch *Bartonella* spp. betroffen zu sein (Breitschwerdt, Maggi et al. 2010).

2003 zeigte eine randomisierte Studie, dass Doxycyclin in Kombination mit Gentamicin in der Behandlung der chronischen Bakteriämie wirksam ist (Rolain, Brouqui et al. 2004).

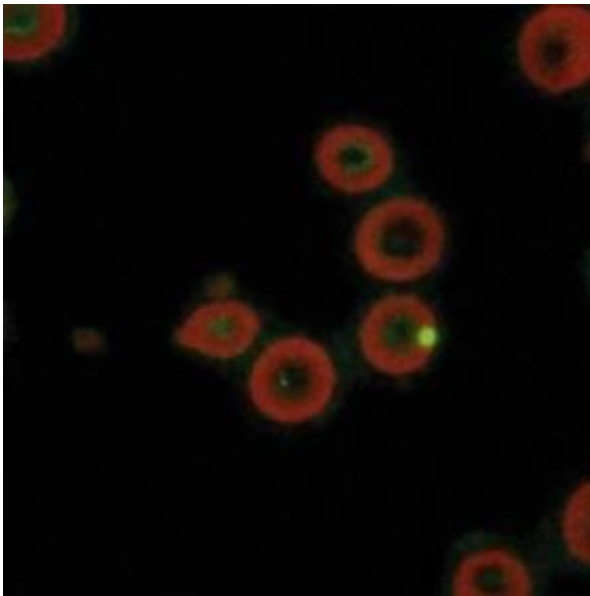


Abb. 4: Darstellung der intraerythrozytären Präsenz von *Bartonella quintana* mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM). 400-fache Vergrößerung (Foucault, Brouqui et al. 2006).

1.4.4. Infektiöse Endokarditis

Es wurde bereits über viele Fälle von *Bartonella*-Endokarditis berichtet (Karem, Paddock et al. 2000; Fournier, Lelievre et al. 2001). Sowohl *B. quintana* als auch *B. henselae* konnten als Erreger nachgewiesen werden (Fournier, Lelievre et al. 2001) (**Abb. 5**). In den meisten Fällen wiesen die Patienten Fieber auf sowie zeigten sich in der Echokardiographie Vegetationen. Mehr als 90 % der Patienten benötigten eine Herzklappenoperation. Die *B. quintana*-Endokarditis entwickelt sich meistens bei Personen ohne vorbestehende Klappenveränderungen. Bekannte Risikofaktoren sind Alkoholismus, Obdachlosigkeit und Körperläusebefall. Patienten mit *B. henselae*-Endokarditis haben häufig eine vorbestehende Valvulopathie und die Erkrankung ist häufig mit Katzenbissen oder –kratzern vergesellschaftet (Fournier, Lelievre et al. 2001). Die Wirksamkeit antibiotischer Medikamente zur Behandlung einer *Bartonella*-Endokarditis wurde evaluiert. Die empfohlene Therapie bei *B. quintana*-Endokarditis sollte aus Doxycyclin in Kombination mit Gentamicin bestehen (Rolain, Franc et al. 2003; Rolain, Brouqui et al. 2004).

Fälle von akutem Herz- und Multiorganversagen sind trotz antibiotischer Therapie und Herzklappenoperation bei einer *Bartonella*-Endokarditis jedoch nicht ungewöhnlich (Raoult, Fournier et al. 2003; Rolain, Franc et al. 2003; Dimopoulos, Eleftherakis et al. 2012).

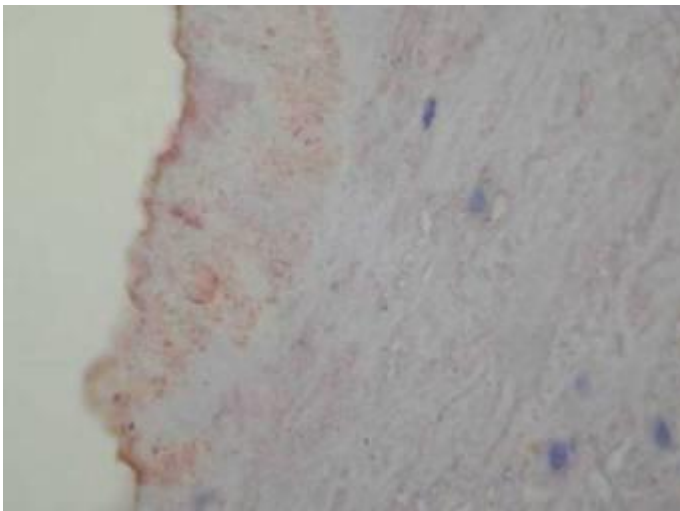


Abb. 5: Immunhistochemische Darstellung von *Bartonella* spp. in der Herzklappe eines Patienten mit Endokarditis. 400-fache Vergrößerung. (Foucault, Brouqui et al. 2006)

1.5. Durch *Bartonella bacilliformis* verursachte Erkrankungen

Während die meisten durch *Bartonella quintana* und *Bartonella henselae* verursachten Erkrankungen, v.a. bei Immunkompetenten, nur limitierte Symptome verursachen, ist *Bartonella bacilliformis* als tödliches Pathogen bekannt.

B. bacilliformis ist der Erreger der Carrion-Krankheit (Maguina, Garcia et al. 2001). Der Erreger wurde erstmals 1905 von Barton aus dem Blut eines an Oroya-Fieber erkrankten Patienten mikroskopisch nachgewiesen (Hahn 2005). Die Sandmücke überträgt als Vektor das Bakterium von Mensch zu Mensch. Die Krankheit tritt im Lebensraum des Vektors, den westlichen Abhängen der Anden oberhalb von 800 m Höhe in Peru, Ecuador und Kolumbien, auf (Maguina, Guerra et al. 2009; Mosepele, Mazo et al. 2012). Das Bakterium verbleibt primär in Erythrozyten, sekundär kommt es zu einer Kolonialisierung

der Milz und anderer Organe. Einziges bekanntes Reservoir ist der Mensch. Die Erkrankung weist einen biphasischen Verlauf auf. Im akuten Stadium, dem Oroya-Fieber, kommt es über zwei bis vier Wochen zu hohem Fieber, Lymphknotenschwellungen, Hepatosplenomegalie und schwerer hämolytischer Anämie (Eicher and Dehio 2012), die bei bis zu 80 % der betroffenen Patienten tödlich verlaufen kann (Harms and Dehio 2012). Es folgt eine Phase ausgeprägter Immunsuppression, die früher ohne Antibiotikagabe, vor allem wegen Sekundärinfektionen wie Salmonellose und Tuberkulose, meist letal verlief (Maguina, Garcia et al. 2001; Mosepele, Mazo et al. 2012). Wird die erste Krankheitsphase ohne antibiotische Therapie überstanden, entwickeln sich zwei bis vier Monate später vaskuloproliferative und Hämangiom-ähnliche Hautveränderungen, die sogenannte Verruga peruana (Peru-Warze). Dieser Zustand hält meist einige Monate an, bevor er spontan abheilt (Maguina, Garcia et al. 2001; Hahn 2005). Interessant ist, dass der Name dieser biphasisch verlaufenden Infektion und die Entdeckung der Verbindung zwischen den beiden Krankheitsphasen – Oroya-Fieber und Peru-Warze – auf Daniel Acides de Carrión, einen peruanischen Medizinstudenten, zurückzuführen sind, der an Oroya-Fieber starb, nachdem er sich mit Blut aus einer Peru-Warze infiziert hatte (Schultz 1968; Minnick and Battisti 2009).

1.6. Diagnostik

Bartonella spp. ist eine Gattung sehr langsam wachsender Bakterien. Daher wird der indirekte Immunfluoreszenztest zum serologischen Nachweis von Antikörpern vorrangig zur Diagnosestellung eingesetzt (Regnery, Anderson et al. 1992; Maurin and Raoult 1996). Die Erregeranzucht in der Zellkultur ist sehr zeitintensiv und anspruchsvoll, gleichzeitig gilt sie jedoch als erfolgreichste Nachweismethode (Bolin, Norlander et al. 1982). Zudem steht der DNA-Nachweis des Bakteriums mittels PCR und anschließender 16S rRNA-Sequenzierung oder Hybridisierung aus frischen oder formalinfixierten

Gewebeproben zur Verfügung (Drancourt and Raoult 1993; Anderson, Sims et al. 1994; Maurin and Raoult 1996). Aber auch der DNA-Nachweis aus Blutproben gewinnt zunehmend an Bedeutung (Kawasato, de Oliveira et al. 2013).

1.7. Pathogenität von *Bartonella* spp.

Die Übertragung von *Bartonella* spp. erfolgt über traumatischen Kontakt mit infizierten Tieren oder über blutsaugende Arthropoden; im letzteren Fall am ehesten durch Übertragung von kontaminierten Insektenfäzes über Hautläsionen des Wirtes (Chomel, Boulouis et al. 2009).

Man geht davon aus, dass *Bartonella* spp. Erythrozyten nicht sofort nach Infektion des Wirtes besiedeln kann, sondern zunächst in einer „primären Nische“ verbleibt, bevor weitere Schritte des Infektionszyklus stattfinden. Man vermutet, dass diese Nische das vaskuläre Endothel involviert. Im weiteren Verlauf greift die Infektion auf das Blut über, wo der Erreger Erythrozyten invadiert und die für *Bartonella* spp.-Infektionen charakteristischen persistierenden, intraerythrozytären Bakteriämien verursacht, um so weitere Übertragungen durch den Vektor zu ermöglichen (**Abb. 6**) (Seubert, Schulein et al. 2002; Eicher and Dehio 2012; Harms and Dehio 2012).

Während des gesamten Infektionszyklus kommt das Fehlen einer effektive Immunantwort der Wirtszellen und eine nur moderate Entzündungsreaktion dem Erreger *Bartonella* zugute. Diese kommen sowohl über eine passive Umgehung der Immunantwort als auch eine aktive Immunmodulation zustande (Harms and Dehio 2012).

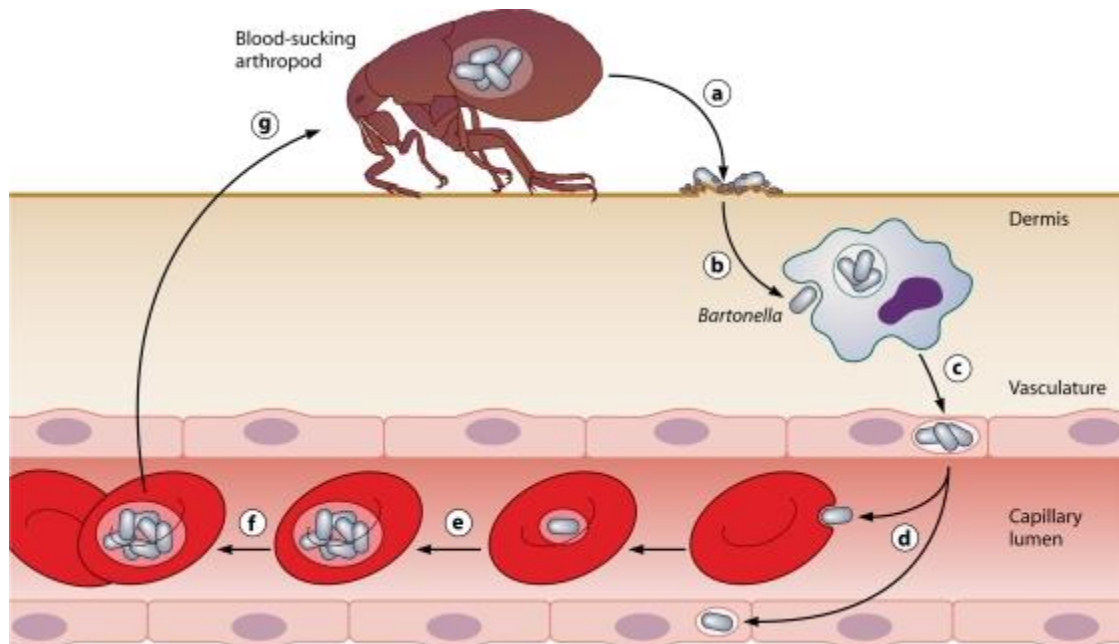


Abb. 6: Schematische Darstellung des vermuteten Infektionszyklus von *Bartonella* spp. Nach Transmission durch einen Vektor (a) besiedelt *Bartonella* spp. vermutlich nach Eindringen in migrierende Zellen (b) sowie den Transport in das vaskuläre Endothel (c) eine „primäre Nische“, in der der Erreger intrazellulär persistiert. Von der „primären Nische“ aus wird der Erreger in die Blutbahn gesät (d), wo er in Erythrozyten invadiert und die „primäre Nische“ reinfiziert. Nach begrenzter Vermehrung in roten Blutzellen (e) persistiert der Erreger intraerythrozytär (f) und ist bereit für eine erneute Transmission durch blutsaugende Arthropoden (d) (Harms and Dehio 2012).

1.7.1. Pathogenität von *Bartonella henselae*

Persistierende Bakteriämien sowie schwerwiegende Verläufe von Infektionen durch *Bartonella henselae* wurden sowohl bei Immunkompetenten als auch bei Immunsupprimierten beschrieben (Lucey, Dolan et al. 1992). Sie kommen jedoch hauptsächlich bei Patienten mit eingeschränkter zellulärer Immunität (z.B. HIV-Infizierten oder nach Organtransplantation) vor (Regnery, Anderson et al. 1992; Caniza, Granger et al. 1995; Mosepele, Mazo et al. 2012). Aus dieser Beobachtung heraus ergab sich die Hypothese, dass *Bartonella* spp. durch intrazelluläre Persistenz die Abwehrmechanismen des Wirtes umgeht (Pulliainen and Dehio 2012).

Die folgenden Beobachtungen bekräftigen diese Vermutung:

- Nur Antibiotika, die über ein hohes Penetrationsvermögen in die Zelle verfügen (z.B. Makrolide) zeigen eine Wirksamkeit in der Behandlung einer *B. henselae*-Infektion.
- Insbesondere bei Immunsupprimierten zeigen sich auch nach antibiotischer Behandlung oder scheinbarer Ausheilung der Bakteriämie rezidivierende Krankheitsverläufe, die auf einen Verbleib des Erregers in einer am ehesten intrazellulären Nische hindeuten, die vor therapeutischen Angriffen geschützt ist und von der aus erneute Bakteriämien entstehen (Harms and Dehio 2012).
- Zudem konnte durch Verwendung eines Lysezentrifugationssystems eine größere Keimzahl beim Ausplattieren von peripherem Blut erreicht werden als durch Anwendung herkömmlicher Methoden, was für eine intrazelluläre Persistenz des Erregers spricht (Brenner, Rooney et al. 1997).

Von *B. henselae* weiß man, dass es in verschiedene Zelltypen, wie beispielsweise Endothelzellen (Dehio, Meyer et al. 1997), endotheliale und hämatopoetische Progenitorzellen (Mandle, Einsele et al. 2005; Salvatore, Casamassimi et al. 2008), Epithelzellen (Batterman, Peek et al. 1995) sowie Monozyten und Makrophagen (Musso, Badolato et al. 2001; Kempf, Schairer et al. 2005) eindringen kann.

Für die Pathogenität von *B. henselae* spielen nach dem derzeitigen Wissen zwei Gruppen von Pathogenitätsfaktoren eine entscheidende Rolle: *trimeric autotransporter adhesins* (TAAs) und Typ IV-Sekretionssysteme (*type IV secretion systems*).

TAAs sind gut erforschte und weitverbreitete Virulenzfaktoren, die für die Pathogenität vieler gramnegativer Bakterien, wie beispielsweise *Yersinia enterocolitica*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* und *Neisseria meningitidis* (Hoiczky, Roggenkamp et al. 2000; Linke, Riess et al. 2006) von Bedeutung sind.

Auch im Genom von *B. henselae*, *B. quintana* sowie weiteren Spezies aus der Gattung *Bartonella* konnten sie nachgewiesen werden. Sie gehören dem Typ V-Sekretionssystem (*type V secretion system* (TVSS)) an (Eicher and Dehio 2012) und binden typischerweise an Oberflächenproteine der extrazellulären Matrix (ECM) (Linke, Riess et al. 2006).

Das TAA *Bartonella* Adhäsins A (BadA) (**Tab. 2**) stellt einen wichtigen Pathogenitätsfaktor von *B. henselae* dar. Es handelt sich um ein hochmolekulares (340 kDa), hochrepetitives, nicht-fimbrielles Adhäsins (Hoiczky, Roggenkamp et al. 2000), welches sich auf der Außenmembran von *B. henselae* befindet und homologe Domänen zu *Yersinia* Adhäsins A (YadA) von *Yersinia enterocolitica* aufweist. BadA vermittelt die bakterielle Adhärenz an Wirtszellen und extrazelluläre Matrixproteine (z.B. Kollagen, Laminin und Fibronectin) und hat antiphagozytäre Funktion (für YadA bereits bekannt) (China, N'Guyen et al. 1994; Visser, Hiemstra et al. 1996; Riess, Andersson et al. 2004). Zudem triggert es die Induktion eines angiogenetischen Genprogramms über eine Aktivierung von *hypoxia inducible factor* (HIF)-1, dem Schlüsselfaktor der Angiogenese, mit nachfolgender Sekretion von angiogenetischen Zytokinen (z. B. *vascular endothelial growth factor* (VEGF)) (Kempf, Volkmann et al. 2001; Riess, Andersson et al. 2004; Franz and Kempf 2011). Ein durch Transposon-Mutagenese hergestellter Klon von *B. henselae*, der BadA nicht exprimieren kann (BadA⁻), bindet weniger effektiv an Kollagen I, III und IV sowie an Laminin und Fibronectin (Riess, Andersson et al. 2004), was zu einer deutlich abgeschwächten Adhärenz führt. Es konnte gezeigt werden, dass die Kopfregion von BadA für die Bindung an Endothelzellen und Kollagen essentiell ist sowie die Autoaggregation fördert, wohingegen die Stielregion von BadA für die Bindung an Fibronectin unentbehrlich ist (Riess, Andersson et al. 2004; Kaiser, Riess et al. 2008; Kaiser, Linke et al. 2012).

Weitere wichtige Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae* stellen die Typ IV-Sekretionssysteme (*type IV secretion systems*) (**Tab. 2**) dar.

Im Wesentlichen zu nennen ist in diesem Zusammenhang das VirB/VirD4 *type IV secretion system*, das verschiedene Funktionen ausübt. Es vermittelt die Umlagerung des Aktinzytoskeletts, was in der Formation eines bakteriellen Aggregates auf der Wirtszelloberfläche resultiert, das nachfolgend als sogenanntes Invasom in die Zelle aufgenommen wird. Es ist zudem wesentlich an der Inhibition der Apoptose sowie Proliferation von Endothelzellen beteiligt (Schmid, Schulein et al. 2004; Franz and Kempf 2011) und triggert eine proinflammatorische Wirtszellantwort durch Aktivierung von *nuclear factor* (NF)- κ B, welches wiederum die Sekretion von Interleukin-8 und die Expression der Zelladhäsionsmoleküle *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 und E-Selektin auslöst. Darüberhinaus besitzt das VirB/VirD4 *type IV secretion system* die Fähigkeit *Bartonella effector proteins* (Beps) in die Wirtszelle zu translozieren. Bisher konnten sieben *Bartonella effector proteins* (BepA-F) identifiziert werden, die unterschiedliche Funktionen innehaben (z.B. Schutz der Endothelzelle vor Apoptose und Vermittlung von Kapillarwachstum) (Schulein, Guye et al. 2005; Franz and Kempf 2011; Eicher and Dehio 2012). Von BepA weiß man, dass es die Apoptose von Endothelzellen über eine Steigerung der cAMP-Spiegel im Zytosol hemmt (Schmid, Scheidegger et al. 2006; Minnick and Battisti 2009).

Neben dem VirB/VirD4 *type IV secretion system*, konnte im Genom von *B. henselae* ein zweites *type IV secretion system* nachgewiesen werden, welches eine Schlüsselrolle in der wirtsspezifischen Adhärenz an Erythrozyten spielt (Schulein and Dehio 2002; Vayssier-Taussat, Le Rhun et al. 2010). Dies lässt vermuten, dass das Trw *type IV secretion system* (Trw-System) von entscheidender Bedeutung für die Etablierung von chronischen Bakteriämien ist. Eine Rolle im Rahmen der Infektion von Endothelzellen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Seubert, Hiestand et al. 2003).

Als weitere wichtige Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae* (**Tab. 2**) gelten die Oberflächenmembranproteine (*outer membrane proteins*, OMPs), von denen bislang neun in der Größe von 28-171 kDa identifiziert wurden.

Eine Reihe von ihnen (28, 32, 43, 52 und 58 kDa) können an Endothelzellen binden (Burgess and Anderson 1998; Fuhrmann, Arvand et al. 2001; Harms and Dehio 2012). Das 43 kDa OMP scheint jedoch eines der wesentlichen Adhäsine von *B. henselae* darzustellen, da es unter den isolierten OMPs *in vitro* die stärkste Bindungsfähigkeit an Endothelzellen aufwies (Burgess and Anderson 1998). In Versuchen konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Zugabe von *B. henselae* OMPs (23-92 kDa) in der Aktivierung von NF- κ B und der nachfolgenden Geninduktion von ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*) und E-Selektin in Endothelzellen resultierte (Fuhrmann, Arvand et al. 2001). Filamentöse Hämagglutinine (FHAs, *filamentous hemagglutinin adhesins*) sind ein weiteres *type V secretion system* von *Bartonella* spp., welches bisher jedoch nur bei *B. henselae*, *B. grahamii* und *B. tribocorum* nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise weist *B. quintana* keine FHAs auf, obwohl es mit *B. henselae* nahe verwandt ist (Kaiser, Riess et al. 2011; Harms and Dehio 2012). Von Adhäsinen, wie dem filamentösen Hämagglutinin weiß man, dass sie die Adhärenz von gramnegativen Bakterien an Wirtszellen vermitteln (Rojas, Ham et al. 2002; Nicholson, Brockmeier et al. 2009). Gegenwärtig gibt es jedoch keine experimentellen Daten über die Rolle von FHAs im Infektionsprozess durch *B. henselae* (O'Rourke, Schmidgen et al. 2011). Ein Charakteristikum von *Bartonella* spp. ist die Unfähigkeit Protoporphyrin IX oder Hämin zu produzieren, sodass der Erreger auf eine externe Hämin-Zufuhr angewiesen ist (Minnick and Battisti 2009). Auch für *B. henselae* konnte ein Hämin-abhängiges Wachstumsverhalten nachgewiesen werden (Sander, Kretzer et al. 2000). Häminbindende Proteine (*hemin-binding proteins*, Hbps) bilden eine Gruppe von Oberflächenproteinen, die Hämin auf der bakteriellen Oberfläche binden. Man vermutet, dass sie Teil eines Hämin-Aufnahmesystems sind oder direkt an der Wirtszellmanipulation teilhaben. Bei dem initial als ein Phagen-assoziiertes Protein von *B. henselae* charakterisierten Pap31, handelt es sich um ein *hemin-binding protein* (HbpA) (Fuhrmann, Arvand et al. 2001; Zimmermann, Kempf et al. 2003; Harms and Dehio 2012).

Man vermutet, dass es neben der Bindung an Hämin auch eine Rolle in der Bindung an Fibronektin spielt (Harms and Dehio 2012).

Untersuchungen haben gezeigt, dass mit *B. bacilliformis* infizierte Erythrozyten Einstülpungen auf ihrer Zelloberfläche aufweisen, die als „Gruben“ imponieren (Benson, Kar et al. 1986). Man geht davon aus, dass sie im Rahmen des Invasionsprozesses als Eintrittspforten fungieren und durch Deformin verursacht werden (Xu, Lu et al. 1995). Die beschriebenen Einstülpungen der Erythrozytenmembran wurden auch bei Infektion mit *B. henselae* nachgewiesen (Iwaki-Egawa and Ihler 1997). Die genaue Wirkungsweise von Deformin konnte bisher jedoch nicht geklärt werden (Harms and Dehio 2012).

Von *B. henselae* weiß man, dass es über zwei Wege in die Wirtszelle aufgenommen werden kann. Einerseits über kleine Konglomerate von einzelnen oder mehreren wenigen Bakterien mit Bildung von *Bartonella*-enthaltenden Vakuolen (BCV) oder über große Konglomerate als sogenanntes Invasom (Eicher and Dehio 2012; Harms and Dehio 2012). Nach initialem Kontakt zwischen Pathogen und Wirtszelle kommt es zur Zytoskelett-vermittelten Akkumulation der Bakterien auf der Zelloberfläche. Nachfolgend wird das bakterielle Konglomerat *in toto* in die Zelle aufgenommen. Neben Aktin-abhängigen werden Tyrosinkinase-vermittelte Effekte als wesentlich für die Ausbildung des Invasoms angesehen (Dehio, Meyer et al. 1997; Fuhrmann, Arvand et al. 2001).

Tab. 2: Übersicht über bekannte und vermutete Pathogenitätsfaktoren von *Bartonella henselae* (Kempf 2004) – modifiziert nach (Harms and Dehio 2012)

Bezeichnung	Funktion in der Infektion von Wirtszellen	Quelle
TAA <i>Bartonella</i> Adhäsion A (BadA)	Bakterielle Autoaggregation, Adhärenz an extrazelluläre Matrixproteine, Adhärenz an Wirtszellen über β 1-Integrine, Aktivierung von HIF-1 und NF- κ B, VEGF-Sekretion, Inhibierung der Phagozytose durch Makrophagen	(Kaiser, Riess et al. 2008; Harms and Dehio 2012)
VirB/VirD4 <i>type IV secretion system</i>	Inhibition der Apoptose, NF- κ B-abhängige proinflammatorische Wirtszellantwort, Regulierung der Angiogenese, Invasom-Formierung	(Padmalayam, Karem et al. 2000; Schmid, Schulein et al. 2004; Harms and Dehio 2012)
Trw <i>type IV secretion system</i>	Adhärenz an erythrozytäre Zelloberfläche	(Harms and Dehio 2012)
<i>Outer membrane proteins</i> (OMPs)	NF- κ B-abhängige proinflammatorische Wirtszellantwort, Adhärenz an Wirtszellen	(Fuhrmann, Arvand et al. 2001; Harms and Dehio 2012)
OMP43	Adhärenz an Wirtszellen, Bindung an Fibronectin	(Burgess and Anderson 1998; Harms and Dehio 2012)
Filamentöse Hämagglutinine (FHAs)	unbekannt; Adhärenz an Wirtszellen?	(Harms and Dehio 2012)

Fortsetzung Tab. 2: Übersicht über bekannte und vermutete Pathogenitätsfaktoren von *Bartonella henselae*

(Kempf 2004) – modifiziert nach (Harms and Dehio 2012)

Bezeichnung	Funktion in der Infektion von Wirtszellen	Quelle
<i>Hemin-binding proteins</i> (Hbps)	Bindung an Hämin und Fibronektin (HbpA)	(Zimmermann, Kempf et al. 2003; Harms and Dehio 2012)
Deformin	Bildung von Einstülpungen auf erythrozytärer Zellmembran	(Minnick and Battisti 2009; Harms and Dehio 2012)

1.7.2. Pathogenität von *Bartonella quintana*

Im Vergleich zu *Bartonella henselae* ist im Hinblick auf die Pathogenitätsfaktoren von *Bartonella quintana* bislang nur wenig bekannt.

Interaktionen mit verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise Endothel- und Epithelzellen (Batterman, Peek et al. 1995; Dehio, Meyer et al. 1997; Kempf, Schaller et al. 2000), Erythrozyten (Rolain, Arnoux et al. 2003; Rolain, Franc et al. 2003; Rolain, Maurin et al. 2003), humanen Erythroblasten (Rolain, Foucault et al. 2003; Rolain, Franc et al. 2003) sowie Makrophagen (Schulte, Linke et al. 2006) wurden jedoch auch für *B. quintana* beschrieben.

Wie für *B. henselae* konnte zudem auch für *B. quintana* gezeigt werden, dass es nach Invasion in Wirtszellen in *Bartonella*-enthaltenden Vakuolen (BCV, *Bartonella-containing vacuoles*) verbleibt und sich intrazellulär vermehren kann (Brouqui and Raoult 1996; Schulte, Linke et al. 2006). Der genaue Mechanismus, durch den *Bartonella* spp. eine Fusion der *Bartonella*-enthaltenden Vakuole mit den Lysosomen verhindert oder hinauszögert, um sein eigenes Überleben zu sichern, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen (Eicher and Dehio 2012). *Trimeric autotransporter adhesins* (TAAs) spielen

auch in der Pathogenität von *B. quintana* eine wichtige Rolle. Zur Familie der TAAs gehören neben *Bartonella* Adhäsine A (BadA) von *B. henselae*, *Yersinia* Adhäsine A (YadA) von *Yersinia enterocolitica* und *Bartonella repeat protein A* (BrpA) von *Bartonella vinsonii* (Gilmore, Bellville et al. 2005) auch die Vombs (*variably expressed outer membrane proteins*) von *B. quintana* (Zhang, Chomel et al. 2004; Minnick and Battisti 2009; Muller, Kaiser et al. 2011). TAAs konnten bisher für jede *Bartonella*-Spezies, die bislang sequenziert wurde, nachgewiesen werden, variieren jedoch erheblich in ihrer Länge und zeigen Unterschiede in ihrem Aufbau (Linke, Riess et al. 2006; O'Rourke, Schmidgen et al. 2011). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten vier Vombs von *B. quintana* (VompA-D) identifiziert werden (Zhang, Chomel et al. 2004). Sie haben eine Länge von 40 nm und sind somit viel kürzer als BadA von *B. henselae* (Muller, Kaiser et al. 2011). Die biologische Bedeutung der Vombs wurde in verschiedenen Studien untersucht. Sie scheinen sowohl eine Rolle in der Bindung an Kollagen und der Autoaggregation zu spielen, als auch für die Induktion eines angiogenetischen Genprogrammes, vergleichbar mit BadA, wichtig zu sein (Linke, Riess et al. 2006; Harms and Dehio 2012). Für VompA-C konnte die Fähigkeit zur Bindung an Kollagen IV nachgewiesen werden (Zhang, Chomel et al. 2004). Die Unfähigkeit von Vombs an Fibronectin zu binden, hat ihren Ursprung vermutlich im Fehlen einer *fibronectin binding domain*, die für BadA nicht aber für Vombs nachgewiesen werden konnte (Schulte, Linke et al. 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass VompA-C für die Induktion der VEGF-Sekretion in humanen Epithelzellen (HeLa 229-Zellen) und Makrophagen (THP-1-Zellen) von Bedeutung sind, aber keine signifikante Rolle für die Adhärenz an diese Zellen spielen (Schulte, Linke et al. 2006). Die Funktion von VompD bleibt weiterhin zu definieren. Obwohl der JK-31-Stamm von *B. quintana*, der als Vomp⁺ - Wildtyp verwendet wird, alle vier Vomp-Gene exprimiert, scheint VompD nicht exprimiert zu werden (Schulte, Linke et al. 2006), sodass keine direkten Belege über die Funktion dieses Proteins vorliegen (Harms and Dehio 2012).

Vergleichbar mit der Variabilität von *B. henselae* BadA, zeigen auch verschiedene Stämme von *B. quintana* ein unterschiedliches Expressionmuster von Voms. In einem Tiermodell mit Rhesusaffen konnten im Verlauf einer *B. quintana*-Infektion Genvariationen mit dem kompletten Verlust von VompA und/oder VompB während prolongierter Bakteriämien beschrieben werden (Zhang, Chomel et al. 2004; Eicher and Dehio 2012). Vergleichbare Unterschiede in der Genexpression konnten auch in Isolaten von menschlichen Patienten nachgewiesen werden (Zhang, Chomel et al. 2004). Solche Genvariationen von vomp- und badA-Genloci sind vermutlich ein weiterer Mechanismus, um der adaptiven Immunantwort des Wirtes zu entkommen (Eicher and Dehio 2012). Ein kompletter Verlust der Vomp-Expression resultiert jedoch in einem avirulenten Stamm (MacKichan, Gerns et al. 2008). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine Vomp⁻ - Mutante von *B. quintana* keine Bakteriämie verursachen kann (Zhang, Chomel et al. 2004). Um die Bedeutung von Voms für die Pathogenität von *B. quintana* genauer zu verstehen, sind jedoch weitere Studien notwendig.

Über die Induktion der Apoptose durch *B. quintana* wurden widersprüchliche Ergebnisse gefunden. Während die Apoptose von Endothelzellen früh während der Infektion durch *B. quintana* nachweisbar war, wurde diese zu einem späteren Zeitpunkt jedoch gehemmt (Liberto, Matera et al. 2003).

1.8. Angiogenese

1.8.1. Physiologische Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man das Wachstum von kleinen Blutgefäßen, die überwiegend durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem entstehen. Sie spielt im adulten Leben eine wichtige Rolle etwa als Reparaturprozess bei der Wundheilung sowie beim Aufbau der Uterusschleimhaut (Folkman 1995; Ferrara 2000). Bei der Angiogenese handelt es sich um einen komplexen Prozess, bei dem die zur Bildung der Gefäßwände

notwendigen Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen durch verschiedene angiogenetische Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *fibroblast growth factor* (FGF) aktiviert werden. Hierbei wird das die Kapillare umgebende Bindegewebe lysiert, und es erfolgt eine Migration kleiner Zellausläufer in das Gewebe. Neue Kapillaren entstehen durch Proliferation und Migration von vorbestehenden Endothelzellen (Folkman and Klagsbrun 1987; Risau 1997; Rehman, Li et al. 2003). Hiervon zu unterscheiden ist die Neubildung von Blutgefäßen aus den sogenannten endothelialen Vorläuferzellen (endotheliale Progenitorzellen, EPCs), welche als Vaskulogenese bezeichnet wird. Diese Form der Angiogenese spielt insbesondere bei der Entwicklung des Gefäßsystems während der Embryonalzeit eine Rolle (Risau 1997). Die endothelialen Vorläuferzellen differenzieren sich in arterielle und venöse Endothelzellen und bilden zunächst ein primitives vaskuläres Labyrinth aus, das in ein komplexeres Netzwerk aus voneinander abgegrenzten Arterien und Venen umgebildet wird (Carmeliet 2003).

1.8.2. Pathologische Angiogenese

Die pathologische Angiogenese zeichnet sich durch eine quantitativ fehlgesteuerte Gefäßbildung (verstärkte oder verringerte Angiogenese) sowie durch funktionell inadäquate Gefäße aus. Dabei liegt ein Ungleichgewicht von stimulatorischen und inhibitorischen Faktoren zugrunde.

Beispiele für pathologische Angiogenese sind die Tumor-Neoangiogenese (Folkman 1971; Folkman, Merler et al. 1971), die diabetische Retinopathie, entzündliche Erkrankungen (Psoriasis, rheumatoide Arthritis, Asthma, Arteriosklerose) (Szekanecz, Besenyei et al. 2009) sowie virale Infektionskrankheiten (z.B. das Kaposi-Sarkom durch HHV-8 bei AIDS-Patienten) (Chang, Cesarman et al. 1994; Carmeliet 2000; Carmeliet and Jain 2000; Schmiederer and Anderson 2000; Scadden 2003). Bei manchen Erkrankungen, wie der koronaren Herzerkrankung ist eine Neoangiogenese

therapeutisch erwünscht (Lei, Haider et al. 2004), während bei anderen Erkrankungen, wie der proliferativen diabetischen Retinopathie oder Tumor-Neoangiogenese, eine Hemmung der Neoangiogenese wünschenswert ist (Carmeliet 2003). Bei der Entstehung solider Tumoren spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle. Ohne Angiogenese, die die Nährstoffversorgung des Tumors gewährleistet, sind ein Wachstum sowie eine Metastasierung kaum vorstellbar (Folkman 1971; Folkman, Merler et al. 1971; Carmeliet and Jain 2000). Bei der Tumorangiogenese entstehen wirre, nicht ausreichend ausgereifte Gefäßnetzwerke, die in einer heterogenen Durchblutung des Tumorgewebes resultieren. Während an manchen Stellen durch die erhöhte Permeabilität Blutbestandteile vermehrt austreten, findet sich an anderen Stellen gar kein oder gar ein retrograder Blutfluss, was eine effiziente Applikation von antineoplastischen Medikamenten erschwert.

Grundsätzlich ist die pathologische Angiogenese durch ähnliche molekulare Mechanismen gesteuert wie die physiologische Angiogenese.

1.8.3. Pathologische Angiogenese durch *Bartonella* spp.

Unter den bakteriellen Pathogenen sind nur Spezies aus der Familie der *Bartonellaceae* (*B. bacilliformis*, *B. henselae* und *B. quintana*) bekannt, die angioproliferative Fähigkeiten besitzen (Hahn 2005) und vaskuloproliferative Läsionen wie die BA und PH induzieren können (Garcia, Wojta et al. 1990; Maurin and Raoult 1996; Koehler, Sanchez et al. 1997).

Die angiogenetischen Fähigkeiten von *Bartonella* spp. können in direkte (mitogene und antiapoptotische Stimulation von Endothelzellen) sowie indirekte (Induktion auto- und parakriner Zytokin-Sekretion) Mechanismen unterteilt werden, die jedoch zusammenwirken (Harms and Dehio 2012). Im Falle von vaskuloproliferativen Erkrankungen wie der bazillären Angiomatose und Peliosis hepatis sind die Tumoren vollständig von der Präsenz lebender Bakterien abhängig, da eine Eradikation des Pathogens durch antibiotische Therapie die Läsionen wirkungsvoll beseitigt (Rolain, Brouqui et al. 2004).

1.9. Zytokine

Zytokine sind im Körper vorkommende natürliche Botenstoffe. Sie stellen eine uneinheitliche Gruppe von Glykoproteinen dar, die von unterschiedlichen Zellen gebildet werden. Sie dienen als Mediatoren zur Kommunikation der Zellen untereinander und üben regulierende Funktionen für die Proliferation, die Differenzierung und die Aktivierung von Zellen aus. Neben ihrer parakrinen Wirkung modulieren sie auch systemische Reaktionen wie Fieber und sind an dem Geschehen des septischen Schocks beteiligt (Endres, van der Meer et al. 1987; Cannon, Tompkins et al. 1990). Selbst psychische Stress-Situationen beantwortet der Körper mit einer Alteration in der Produktion regulatorischer Zytokine (Marshall, Agarwal et al. 1998). Einige Zytokine spielen eine wichtige Rolle für immunologische Reaktionen und können dann als Mediatoren bezeichnet werden, andere wirken beispielsweise als Wachstumsfaktoren.

Man unterscheidet im wesentlichen fünf Hauptgruppen von Zytokinen: Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. In der Zellbiologie nimmt die Bedeutung der Zytokine ständig zu. Mehrere Zytokine werden heute bereits kommerziell als rekombinante Proteine produziert. Angiogenetische Aktivität wurde insbesondere bei VEGF und IL-8 sowie bei TNF- α , Angiopoetin-1 und -2 beschrieben (Frater-Schroder, Risau et al. 1987; Ferrara and Henzel 1989; Koch, Polverini et al. 1992; Zangwill, Hamilton et al. 1993).

1.9.1. Proangiogenetisch wirksame Zytokine

1.9.1.1. Das Zytokin *vascular endothelial growth factor* (VEGF)

Das Zytokin *vascular endothelial growth factor* (VEGF) entfaltet sowohl in der Vaskulogenese (*de novo* Bildung des embryonalen Blutkreislaufes) als auch in der physiologischen Angiogenese seine Wirkung. Aber auch bei der pathologischen Angiogenese, die bei Neoplasien

(Folkman 1971; Folkman, Merler et al. 1971), der proliferativen Retinopathie, entzündlichen Erkrankungen sowie viralen Infektionskrankheiten eine Rolle spielt (Carmeliet 2000; Carmeliet and Jain 2000), wird VEGF eine führende Rolle zugeschrieben (Ferrara 2000).

VEGF stimuliert hauptsächlich vaskuläres Endothel. Beispielsweise induziert es die endotheliale Fenestrierung in bestimmten Gefäßsystemen und führt so, dosisabhängig, zu einer Vasodilatation durch Stimulation der NO-Synthese in Endothelzellen (Ku, Zaleski et al. 1993). VEGF hat aber auch Einfluss auf weitere Zellen. Es stimuliert die Migration und Proliferation von Monozyten und Makrophagen sowie die Teilung und Migration von Endothelzellen.

Insgesamt sind sieben verschiedene Formen des VEGF bekannt: VEGF A-F sowie PlGF (*placental growth factor*) (Yla-Herttuala, Rissanen et al. 2007). VEGF-A ist der Schlüsselregulator des Blutgefäßwachstums. Eine erhöhte Expression von VEGF-A wird bei einer Reihe von Tumoren, wie beispielsweise dem Kaposi-Sarkom sowie der bazillären Angiomatose, gefunden (Masood, Cai et al. 1997). Zudem spielt die Interaktion zwischen VEGF und dem VEGF-Rezeptor (VEGFR) in der Niere eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Organs und in der Aufrechterhaltung der Filtrationsbarriere (Izzedine, Rixe et al. 2007).

Da Endothelzellen nach Infektion durch *B. henselae* typischerweise selbst kein VEGF sezernieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass die VEGF-Produktion in anderen Zelltypen sowie parakrine Signale an Endothelzellen, eine entscheidende Rolle spielen (Resto-Ruiz, Schmiederer et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass humane Ea.hy926- und THP-1-Zellen, die mit *B. henselae* infiziert werden, das Wachstum von Endothelzellen stimuliert (Kempf, Volkmann et al. 2001; Resto-Ruiz, Schmiederer et al. 2002), zweifellos da sie VEGF und vermutlich weitere proangiogenetische Faktoren wie IL-8 und IL-1 β (McCord, Resto-Ruiz et al. 2006) sezernieren. Infizierte Endothelzellen locken durch Chemotaxis (Sekretion von *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1)) VEGF-sezernierende Zellen an (McCord, Burgess et al. 2005).

Auch in Monozyten, Makrophagen sowie Epithelzellen konnte eine Stimulation der VEGF-Sekretion nach Infektion mit *B. henselae* und *B. quintana* (Kempf, Lebidziejewski et al. 2005; Kempf, Schairer et al. 2005; Schulte, Linke et al. 2006) nachgewiesen werden.

Histologische Analysen von Peru-Warzen zeigten, dass die Infektion durch *B. bacilliformis* die Produktion von VEGF und seiner Rezeptoren VEGF-1 und VEGF-2 stimuliert (Cerimele, Brown et al. 2003).

1.9.1.2. Regulation der VEGF-Sekretion

Da VEGF eine Schlüsselrolle in der Regulation der Angiogenese spielt, wird seine Expression durch viele verschiedene externe Faktoren beeinflusst. Die stärksten Stimulatoren auf die VEGF-Expression sind Hypoxie und Hypoglykämie (Shweiki, Itin et al. 1992). Weitere wichtige Einflussfaktoren sind verschiedene Zytokine und aktivierte Onkogene. Die Transkription der VEGF-mRNA wird durch einen Abfall der Sauerstoffkonzentration im Gewebe (Hypoxie) induziert. Die Transkription ist dabei von der Bindung des Transkriptionsfaktors, HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*), an eine HIF-1-Bindungsstelle auf dem VEGF-Promoter abhängig (Liu, Cox et al. 1995). Neben der Hypoxie spielen auch Onkogene, wie beispielsweise v-src, eine Rolle bei der HIF-1-Expression (Jiang, Agani et al. 1997).

Desweiteren können verschiedene Zytokine, wie beispielsweise der *fibroblast growth factor-4* (FGF-4) (Deroanne, Hajitou et al. 1997), der *platelet derived growth factor* (PDGF) (Finkenzeller, Sparacio et al. 1997), der *insulin like growth factor*, *keratinocyte growth factor* und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Ryuto, Ono et al. 1996), die VEGF-Produktion induzieren.

Auch eine Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen, wie beispielsweise von p53 (Van Meir, Polverini et al. 1994) oder dem von Hippel-Lindau (vHL)-Gen (Maher and Kaelin 1997), führt zu einer Überexpression von VEGF.

1.9.1.3. Das Zytokin Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 (IL-8) ist ein klassisches Chemotaxin und ein Modulator des Immunsystems (Kampik, Schulte et al. 2000). Es wird nach Induktion durch den Tumornekrosefaktor- α oder Interleukin-1 von verschiedenen Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen sezerniert. Als Entzündungsmediator ist es an der chemotaktischen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie T- und B-Lymphozyten in das entzündete Gewebe involviert (Baggiolini and Clark-Lewis 1992). Über diese inflammatorische Funktion hinaus, ist das IL-8 ein Angiogenesefaktor (Brat, Bellail et al. 2005) und als solcher an der Neubildung von Blutgefäßen beteiligt. Der proangiogenetische Effekt von IL-8 beruht auf dessen Wirkung auf Endothelzellen. Als chemotaktisches Zytokin fördert es die Migration von Endothelzellen in die Extrazellulärmatrix des Gewebes. Es wirkt gleichzeitig antiapoptotisch auf Endothelzellen und fördert deren Proliferation unter Bildung von Kapillarstrukturen. Dieser Mechanismus wird durch die IL-8-induzierte Freisetzung von Extrazellulärmatrix-zersetzenden Metalloproteasen aufrechterhalten (Yla-Herttuala, Rissanen et al. 2007) und spielt, beispielsweise während der Menstruation und der Wundheilung sowie für die Versorgung und damit das Wachstum von Tumoren eine wichtige Rolle. In Experimenten konnte die starke angiogenetische Aktivität von humanem rekombinantem IL-8 auf HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) nachgewiesen werden (Koch, Polverini et al. 1992; Desbaillets, Diserens et al. 1997; Yoshida, Ono et al. 1997; Kim, Uehara et al. 2001), was für die Entstehung von angioproliferativen Erkrankungen wie der BA oder PH eine wichtige Rolle spielt.

1.9.1.4. Regulation der IL-8-Induktion

Die Expression von IL-8 wird, im Gegensatz zu VEGF, nicht von dem Transkriptionsfaktor HIF-1 kontrolliert, sondern steht unter der Kontrolle der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, CCAAT-Verstärker bindendes

Protein- β (C/EBP- β) und *activating protein-1* (AP-1) (Strieter 2002), deren Signalweg jedoch auch von Hypoxie, dem entscheidenden Stimulus der Angiogenese, beeinflusst zu sein scheint.

Der Bindungsstelle für NF- κ B kommt zwar für die meisten Stimuli die wesentliche Bedeutung in der Induktion der Transkription zu, aber für eine maximale Expression von IL-8 wurde in vielen Zelltypen die Kooperation mit C/EBP- β oder AP-1 als notwendig nachgewiesen (Matsusaka, Fujikawa et al. 1993; Stein and Baldwin 1993; Stein, Cogswell et al. 1993; Kunsch, Lang et al. 1994). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Sekretion von IL-8 in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Endothelzellen (Goebeler, Yoshimura et al. 1997) durch Zugabe von IL-1 β , LPS, TNF- α und GM-CSF sowie durch Hypoxie oder UVB-Strahlen stimulieren lässt (Degli-Esposti, Davis-Smith et al. 1997; Bar-Eli 1999; Huang, DeGuzman et al. 2000).

Für humane Endothelzellen konnte bisher die Regulation auf der Ebene der Transkriptionskontrolle und dort die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an der Induktion von IL-8 durch LPS nachgewiesen werden (Hippenstiel, Soeth et al. 2000; Huang, DeGuzman et al. 2000).

Im Tierversuch wirkt sich IL-8 deutlich auf das Tumorwachstum und die Metastasierung, beispielsweise von Melanomzellen, sowie auf deren angiogenetische Potenz aus (Singh, Gutman et al. 1994; Luca, Huang et al. 1997; Rofstad and Halsor 2002).

1.10. Makrophagen und bakterielle Infektion

Die Aufnahme und Zerstörung von Mikroorganismen ist ein wichtiger Mechanismus der Wirtszellabwehr, die durch phagozytierende Zellen wie Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten, ausgeführt wird. Als wichtiger Bestandteil der angeborenen zellulären Immunität nehmen Makrophagen vor allem im Rahmen akuter Infektionen eine zentrale Stellung ein und tragen wesentlich zur schnellen Bekämpfung von Pathogenen bei. Sie entwickeln sich aus pluripotenten Knochenmarksstammzellen zu Monozyten

und zirkulieren zunächst im Blutkreislauf durch den Körper. Sie verlassen diesen schließlich und wandern ins Gewebe ein, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren und ihre Funktion der angeborenen Immunität erfüllen (Janeway 2002). Die Gewebsmakrophagen sind in vielen verschiedenen Organen, wie beispielsweise Lunge, Leber, Lymphknoten, Gehirn und Milz, zu finden (Janeway 2002). Die Fähigkeit, zahlreiche Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Viren oder Protozoen (Edelson 1982), aber auch geschädigte Zellen sowie Antigen- Antikörper-Komplexe zu beseitigen, zeichnet sie aus (Mantovani 1981; Edelson 1982).

Voraussetzung dafür ist, dass der Phagozyt das zu phagozytierende Objekt erkennt und über Rezeptoren bindet. Dies kann über zwei Wege erfolgen: einen direkten, bei dem Oberflächenstrukturen unmittelbar erkannt werden und einen opsoninvermittelten Weg. Bei Letzterem werden die Zielstrukturen durch Opsonine, wie z.B. Komplementkomponenten, Antikörper oder Akute-Phase-Proteine beladen, welche an Opsoninrezeptoren der Phagozyten binden (Janeway 2002). Die körperfremden Proteine werden nachfolgend in einem Phagozytose genannten Prozess aufgenommen, abgetötet und abgebaut. Die Phagozytose ist ein aktiver Prozess, bei dem das gebundene Pathogen zuerst von der Membran des Phagozyten umhüllt und dann in einem Vesikel aufgenommen wird, das man als Phagosom bezeichnet. Dieses verschmilzt mit einem oder mehreren Lysosomen zum Phagolysosom. Die Lysosomen enthalten Enzyme, Proteine und Peptide, die eine intrazelluläre antimikrobielle Reaktion bewirken können. Im Phagolysosom wird der Inhalt des Lysosoms freigesetzt, der den Krankheitserreger zerstört (Janeway 2002).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus in der Interaktion zwischen Bakterien und Makrophagen besteht in der Aktivierung der Makrophagen. Durch den Kontakt mit dem Pathogen werden diese aktiviert und sezernieren Zytokine, wie beispielsweise VEGF und IL-8, sowie weitere Mediatoren. Sie locken aus dem Blut z.B. neutrophile Granulozyten und weitere Monozyten an, worauf es zu einer lokalen Entzündung kommt, die sich durch Rötung, Schwellung, Schmerz,

Überwärmung und Funktionseinschränkung auszeichnet (Aderem and Underhill 1999; Janeway 2002). Es ist bekannt, dass viele Bakterien Verteidigungsstrategien gegen die Abtötung durch Makrophagen besitzen. Sie kontrollieren dadurch ihr Schicksal in der Zelle selbst und unterhalten so eine chronische Infektion (Scott, Hoth et al. 2003). *Escherichia coli* exprimiert beispielsweise bei Kontakt zu NO vermehrt Superoxiddismutase und DNA-Reparaturenzyme, um sich vor dem oxidativen Schaden zu schützen (Nunoshiba, DeRojas-Walker et al. 1995). Die Reifung des Phagosoms ist fundamental für die Kontrolle von intrazellulären Pathogenen. Mykobakterien verhindern jedoch die Reifung des Phagosoms und die Fusion mit Lysosomen (Hart, Armstrong et al. 1972; de Chastellier and Thilo 1997). Auch von *Bartonella* spp. weiß man, dass es Verteidigungsstrategien besitzt, um der Wirtszellabwehr zu entkommen (Musso, Badolato et al. 2001). Für *B. henselae* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es für mindestens drei Tage in Makrophagen überleben kann (Kyme, Haas et al. 2005). Man vermutet, dass insbesondere der Verbleib des Bakteriums in einer *Bartonella*-enthaltenden Vakuole, das intrazelluläre Überleben des Bakteriums verlängert. Auch für *Bartonella quintana* konnte dies nachgewiesen werden (Schulte, Linke et al. 2006). Die Aufnahme von *B. henselae*, *B. quintana* und *B. bacilliformis* in humane Makrophagen kann über zwei Wege erfolgen. Entweder als einzelnes Bakterium über einen Reisverschluss-ähnlichen Mechanismus (Kempf, Schaller et al. 2000) oder in Form großer Konglomerate in einer bemerkenswerten Struktur, die als Invasom bekannt ist (Dehio, Meyer et al. 1997). Die Aufnahme eines einzelnen Bakteriums oder mehrerer weniger Bakterien bringt *Bartonella*-enthaltende Vakuolen hervor, die nicht mit den Lysosomen verschmelzen, aber sich im perinukleären Raum anhäufen (Brouqui and Raoult 1996; Verma, Davis et al. 2000; Kyme, Haas et al. 2005; Schulte, Linke et al. 2006; Harms and Dehio 2012). Über das exakte Kompartiment, in dem das Pathogen verbleibt und über die bakteriellen Gene, die in das intrazelluläre Überleben involviert sind, ist jedoch nur wenig bekannt.

1.11. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Interaktion von *Bartonella quintana* mit humanen Makrophagen sowie die dadurch induzierte Wirtszellantwort auf zell- und molekularbiologischer Ebene zu analysieren.

Da *B. quintana* ein genetischer Abkömmling von *B. henselae* ist (Alsmark, Frank et al. 2004), sollte untersucht werden, ob die beiden Pathogene ähnliche Pathogenitätsstrategien teilen.

Mittels *Gentamicin-protection-assays* wurden die Adhärenz an sowie die Invasion und intrazelluläre Persistenz in THP-1-Makrophagen nach Infektion mit *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München im Vergleich zu *B. henselae* Marseille untersucht. Die Sekretion der proangiogenetisch und proinflammatorisch wirksamen Zytokine VEGF und IL-8, die eine entscheidende Rolle in der Entstehung der vaskuloproliferativen Erkrankungen bazilläre Angiomatose und Peliosis hepatis spielen, wurde mittels ELISA in den Zellkulturüberständen der infizierten Wirtszellen vermessen.

Von *Bartonella henselae* weiß man, dass der Erreger intrazellulär in Makrophagen auch noch nach 48 Stunden überleben kann. In der vorliegenden Arbeit sollte näher beleuchtet werden, inwieweit auch *B. quintana* diese Fähigkeit besitzt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag zum besseren Verständnis der Bakterien-Wirtszell-Interaktion von *Bartonella quintana* mit THP-1-Makrophagen leisten und so das Verständnis für die Pathogenitätsstrategien von *B. quintana* weiter voranbringen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Brutschränke BBD 6220	Heraeus, Hanau
ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim
Eppendorf-, Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop: Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Superior,
Lauda-Königshofen	
Photometer: Ultrospec 3000 pro	Amersham, Freiburg
Pipetten (1000, 100, 10 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen (pipetus-akku)	Hirschmann Laborgeräte,
Eberstadt	
Steril-Arbeitsbank: BDK-S 1800	BDK, Sonnenbühl
Vortexer: Modell MR 3001 K	Heidolph Instruments,
Schwabach	
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifugen:	
MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Plastik- und Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen: Eppendorf, Hamburg; Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg; Greiner, Nürtingen; Nunc, Roskilde, Dänemark; Sartorius, Göttingen; B.Braun-Melsungen; Sarstedt, Nürnbrecht; Kimberly-Clark, Mühlheim-Kärlich; Millipore, Schwabach.

Einmalküvetten	Sarstedt, Berlin
ELISA-Platten	Nunc, Roskilde
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Impfösen	Sarstedt, Berlin
Mikrotiterplatten (Rundboden)	Greiner, Nürtingen
Optiplatte-Platten (24-well)	Packard BioScience, Meriden, USA
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Falcon/Becton-Dickinson
Pipettenspitzen (10 µl)	Gilson, WI, USA
Pipettenspitzen (1000 µl)	Sarstedt, Berlin
Spitzboden-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon/Becton-Dickinson
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Nunc, Roskilde
Zellkulturplatten (24-well)	Nunc, Roskilde

2.1.3. Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: E. Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Deisenhofen; Biochrom, Berlin.

Bacto Trypton	Difco, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Sigma-Aldrich
Glycerol	E. Merck

Hepes

N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) Biochrom, Berlin

Glutamin Gibco Invitrogen

NaCl (Natriumchlorid) E. Merck

PBS (*phosphate buffered saline*) Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe

PMA (Phorbol-12 Myristat-13-Acetat) Sigma-Aldrich

PNPP (P-Nitrophenyl-Phosphat) Sigma-Aldrich

RPMI 1640 Biochrom, Berlin

Substanz A (Streptavidin) Dako, Neuss

Substanz B (Biotin-alkalische Phosphatase) Dako, Neuss

Trypan-Blau Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tween 20 E. Merck

Alle weiteren Chemikalien wurden von E. Merck bezogen.

2.1.4. Antibiotika

Gentamicin Sigma-Aldrich

Penicillin, Streptomycin Biochrom, Berlin

2.1.5. Rekombinante Zytokine

Rekombinantes humanes IL-8 Pharmingen, San Diego

Rekombinantes humanes VEGF R&D Systems, Wiesbaden

Rekombinantes humanes TNF- α Sigma-Aldrich

2.1.6. Antikörper

Anti-IL-8 (capture/detection) Pharmingen, San Diego

Anti-humanes-VEGF R&D Systems, Wiesbaden

2.1.7. Medien

Die Medien für Zellkultur wurden steril angesetzt und bei + 4 °C gelagert.

Für Infektionsexperimente wurden Medien ohne Antibiotika verwendet.

Tab. 3: Übersicht über die in der Zellkultur (THP-1-Zellen) eingesetzten Medien

Zellkulturmedium	RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) (10 % FCS (hitzeinaktiviert)) 2 mM Glutamin, 10 mM Hepes, 10 µg Streptomycin/ml 100 U Penicillin/ml)
Infektionsmedium	RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) (mit 2 mM Glutamin und 10 mM Hepes ohne FCS, Streptomycin und Penicillin)
Einfriermedium	95 % RPMI 1640 5 % DMSO

Tab. 4: Übersicht über die in der Bakterienkultur eingesetzten Medien

Columbia-Blutagarplatten (CBA) (5 % Schafsblut)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Einfriermedium für Bakterien	LB-Medium mit 20 % Glycerol
LB (Luria-Bertani)-Medium	Fertigpulver von Fa. Becton Dickinson, Heidelberg (Zusammensetzung: 5 g NaCl, 5 g Bacto Hefeextrakt, 10 g Bacto Trypton) in 1 l H ₂ O bidest. lösen; pH 7,4-7,6

2.1.8. Zelllinien

Tab. 5: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzte Zelllinie

Zelllinie	Zelltypus	Organ	Herkunft/Quelle
THP-1	Monozytenzell- linie	Blut: Monozyten- leukämie	DSMZ ACC 16; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland

2.1.9. Bakterienstämme

Tab. 6: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme

Bakterien	Herkunft/Quelle	Referenz
<i>B. henselae</i> Marseille	Patientenisolat, frühe Passage	(Drancourt, Birtles et al. 1996)
<i>B. quintana</i> Toulouse	collection de l'Institut Pasteur, CIP 103739, Paris, Frankreich; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Sander, Freiburg	(Alsmark, Frank et al. 2004)
<i>B. quintana</i> München	Patientenisolat	(Schmidt, Kaliebe et al. 1996)

2.1.10. ELISA**2.1.10.1. VEGF-ELISA**

Kommerzielle VEGF-ELISA-Kits (DuoSet® ELISA Development System) wurden von der Firma R&D Systems, Wiesbaden bezogen.

2.1.10.2. IL-8-ELISA**Tab. 7: Übersicht über Puffer und Lösungen für IL-8-ELISA**

Waschpuffer	PBS + 0,05 % Tween 20
Blockierungspuffer	PBS + 10 % FCS
Substratpuffer	48,5 ml Diethanolamin, 100 mg Natriumazid 400 mg MgCl ₂ × 6 H ₂ O pH 9,8; ad. 500 ml H ₂ O bidest.
Konjugat	4,5 µl Substanz A (Streptavidin) 4,5 µl Substanz B (Biotin-alkalische Phosphatase) 491 µl PBS mischen, 30 min inkubieren und mit PBS auf ein Volumen von 25 ml auffüllen
Entwicklerlösung	1 mg PNPP / ml Substratpuffer
Blockierungspuffer / Tween 20	PBS 10 % FCS 0,05 % Tween 20

2.2. Methoden

2.2.1. Bakterien

2.2.1.1. Herstellung und Kultivierung von Bakterien für *in vitro*-Experimente

Für die Infektionsexperimente wurden *B. henselae* Marseille (Drancourt, Birtles et al. 1996), *B. quintana* München (Schmidt, Kaliebe et al. 1996) und *B. quintana* Toulouse (collection de l'Institut Pasteur, CIP 103739, Paris, Frankreich; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Sander, Freiburg) verwendet (**Tab. 6**). Zur Herstellung der Bakterienstocks wurden die Bakterienstämme auf Columbia-Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut (Becton-Dickinson, Heidelberg) ausgestrichen und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit bebrütet. Nach ~ 5 Tagen wurden die Bakterien mit sterilen Wattestäbchen in Einfriermedium (Luria-Bertani (LB)-Medium mit 20% Glycerol) (**Tab. 4**) geerntet, bei 4 °C, 3500 rpm, 10 min abzentrifugiert (MiniSpin plus, Eppendorf, Hamburg), aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Bakterienzellzahl/ml wurden einen Tag nach dem Einfrieren 2-3 Aliquots aufgetaut, serielle Verdünnungsreihen in PBS hergestellt, diese auf Columbia-Blutagarplatten ausplattiert und die Kolonien nach 2-3 Tagen ausgezählt. Mittels dieser Verdünnungsreihen konnte die Bakterienzellzahl in den Stocks rechnerisch bestimmt werden.

2.2.2. Zellkultur und Infektionsexperimente

2.2.2.1. Auftauen von THP-1-Zellen

In den Experimenten dieser Arbeit wurden Zellen der Linie THP-1 (DSMZ ACC 16, DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland) verwendet. THP-1 ist eine humane Monozytenzelllinie, die aus dem Blut eines einjährigen Jungen mit akuter Leukämie stammt. Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem

cryo freezing container (Lagerung bei $-176\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Flüssigstickstoff) genommen und im Kryoröhrchen in ein $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmes Wasserbad gestellt. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension bei 1500 rpm, RT, 5 min (MiniSpin plus, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert, das Einfriermedium abpipettiert und das Zellpellet in vorinkubiertem Zellkulturmedium ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) resuspendiert. Anschließend wurde das resuspendierte Zellpellet in eine Zellkulturflasche mit 15 ml $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmem Zellkulturmedium (**Tab. 3**) überführt.

2.2.2.2. Kultivierung von THP-1-Zellen

Die THP-1-Zellen wurden zunächst in Zellkulturmedium (**Tab. 3**) in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm^2) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 sowie 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Nach 2-3 Tagen konnten sie in größere Zellkulturflaschen (75 cm^2) überführt werden (15 ml Zellsuspension mit 30 ml frischem Zellkulturmedium) oder weiterhin in kleinen Zellkulturflaschen mit neuem Medium kultiviert werden (1,5 ml Zellsuspension mit 13,5 ml frischem Zellkulturmedium). Die Suspensionszellen wurden maximal 4 Wochen in Kultur gehalten und für Experimente genutzt.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter der Steril-Arbeitsbank durchgeführt. Materialien und Lösungen wurden bereits steril vom Hersteller bezogen oder sterilfiltriert.

2.2.2.3. Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in Suspension wurden $10\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspension mit Trypan-Blau 1:2 verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Die Multiplikation der Anzahl nicht blaugefärbter, also lebender Zellen in einem Großquadrat (4×4 Felder) mit dem Kammerfaktor (1×10^4 Zellen/ml) und dem Faktor der Verdünnung mit Trypan-Blau ergab die Konzentration lebender Zellen in der ursprünglichen Zellsuspension. Um eine zuverlässige Zellzahl zu erhalten, wurden mehrere Großquadrate ausgezählt und die Werte gemittelt.

2.2.2.4. Infektionsexperimente

Für die *in vitro*-Infektionsversuche wurden die Suspensionszellen 30 Stunden vor Infektion in 24-*well*-Zellkulturplatten mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ ausgesät und mit 75 ng PMA (Phorbol-12 Myristat-13-Acetat) pro ml Zellsuspension zur Differenzierung inkubiert. Zwei Stunden vor Infektion wurde das Antibiotika-haltige Zellkulturmedium (**Tab. 3**) abgesaugt und durch Antibiotika-freies Infektionsmedium (**Tab. 2**) ersetzt, um bakterielles Wachstum zu ermöglichen.

Am Tag der Infektion wurden Stockaliquots mit *B. henselae* Marseille, *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München aufgetaut, zentrifugiert (10 min, 6000 rpm, RT, MiniSpin plus, Eppendorf, Hamburg) und in PBS aufgenommen. Die Bestimmung der Bakterienzellzahl/ml erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) in 1 ml Bakteriensuspension mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm, wobei die $OD_{550\text{nm}}$ von 1 einer Konzentration von 5×10^8 Bakterien/ml entspricht. Mittels Dreisatz wurde die tatsächliche Bakterienzellzahl/ml errechnet. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 6000 rpm, RT, MiniSpin plus, Eppendorf, Hamburg) wurde das Zellpelett in Infektionsmedium resuspendiert, um eine Bakteriensuspension mit der gewünschten Bakterienkonzentration von $2,5 \times 10^6$ Bakterien/ml herzustellen. Die *in vitro*-Infektionsversuche wurden mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 100, also mit einem Verhältnis von 100 Bakterien pro Zelle, durchgeführt. Serielle Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension wurden zur Kontrolle der eingesetzten Bakterienzellzahl auf Blutagarplatten ausplattiert und nach ca. 5 Tagen ausgezählt.

Das Infektionsmedium der Zellen wurde abgesaugt und je 1 ml der eingestellten Bakteriensuspension zugegeben. Anschließend wurden die Zellkulturplatten an zentrifugiert, um den Bakterien-Wirtszell-Kontakt zu erleichtern (1500 rpm, 5 min, RT, Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau). Die Bestimmung der Wirtszelladhärenz erfolgte 30 min nach Infektion.

Um die Anzahl abhangerer Bakterien zu bestimmen, wurden die Zellen dreimal in Infektionsmedium gewaschen und eine osmotische Lyse durchgeführt. Hierzu wurden 900 μl destilliertes Wasser hinzugefügt und 4 min inkubiert. Die osmotische Lyse wurde durch Zugaben von 100 μl 10 x PBS (*phosphate buffered saline*) zum Zellysat beendet. Die Bakterienzellzahl wurde durch Ausplattieren der Zellen in 10-facher serieller Verdünnung auf Columbia-Blutagarplatten bestimmt.

Zur Bestimmung der intrazellulären Persistenz wurden die Zellen 1, 4, 24 und 48 h nach Infektion im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die intrazelluläre Bakterienzellzahl wurde anschließend mittels *Gentamicin-protection-assays* bestimmt. Hierzu wurden die infizierten Zellen für 2 h mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin inkubiert, um extrazelluläre Bakterien abzutöten, und anschließend - wie schon beschrieben - eine osmotische Lyse durchgeführt, um die intrazelluläre Bakterienzellzahl durch Ausplattieren der Zellen in 10-facher serieller Verdünnung auf Columbia-Blutagarplatten bestimmen zu können.

2.2.3. Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen: ELISA

2.2.3.1. Gewinnung von Zellkulturüberständen

Die Zytokinproduktion wurde aus Zellkulturüberständen nach bakterieller Stimulation durch Infektion von THP-1-Makrophagen mit *B. henselae* Marseille, *B. quintana* München und *B. quintana* Toulouse mittels ELISA untersucht. Hierzu wurden $2,5 \times 10^5$ THP-1-Monozyten pro *well* im 24-*well*-Format 30 h vor Infektion ausgesät und mit 75 ng PMA pro *well* zu Makrophagen differenziert. 2 h vor Infektion erfolgte ein Mediumwechsel von Zellkulturmedium auf Antibiotika- und FCS-freies Infektionsmedium (**Tab. 3**), um bakterielles Wachstum zu ermöglichen und unspezifische VEGF-Produktion durch FCS (*fetal calf serum*), zu vermeiden.

Anschließend wurden Bakteriensuspensionen von *B. henselae* Marseille, *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München mit der gewünschten Bakterienkonzentration durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) im Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm – wie schon beschrieben – hergestellt, die Zellen mit einer MOI von 100 infiziert und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO² und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden 24 h (IL-8-ELISA) bzw. 48 h (VEGF-ELISA) nach Infektion abgenommen. Hierzu wurde nach der jeweiligen Inkubationszeit je 1 ml des Überstandes pro *well* abpipettiert, in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 14000 rpm, RT, 5 min (MiniSpin plus, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert, um eventuell verbliebene Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zu weiteren Bestimmungen bei -20°C aufbewahrt.

Als Negativkontrolle diente Infektionsmedium (**Tab. 3**). Als Positivkontrolle für den IL-8-ELISA wurde TNF- α (50 ng/ml), für den VEGF-ELISA PMA (25 ng/ml) verwendet.

2.2.3.2. ELISA

Zum Nachweis der Zytokine in Zellüberständen wurden ein VEGF-ELISA bzw. ein IL-8-ELISA angewendet. Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) eignet sich durch seine hohe Sensitivität, um im Zellkulturüberstand die extrem geringen Konzentrationen der Proteine im Pikogramm-Bereich quantitativ nachweisen zu können. Dabei reagiert das zu messende Zytokin in einer Antigen-Antikörper-Reaktion als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper (*capture antibody*), der an einer Mikrotiterplatte anhaftet. Ein hinzugegebener, enzymgekoppelter Sekundärantikörper (*detection antibody*) bindet ebenfalls an das Zytokin und katalysiert gleichzeitig eine Farbreaktion. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Zytokin-Konzentration und kann photometrisch bestimmt werden.

Anhand einer Standardkurve mit rekombinanten Zytokinen (rekombinantes humanes IL-8, Pharmingen, San Diego und rekombinantes humanes VEGF, R&D Systems, Wiesbaden) wird die absolute Konzentration ermittelt.

2.2.3.3. VEGF-ELISA

Zum Nachweis von VEGF mittels VEGF-ELISA (DuoSet® ELISA Development System) im Überstand wurden zunächst nach Protokoll der Herstellerfirma (R&D Systems, Wiesbaden) 96-well-ELISA-Platten mit je 100 $\mu\text{l/well}$ monoklonalem Primärantikörper (*capture antibody*) über Nacht bei RT beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit in den *wells* abgesaugt und die Platten dreimal mit 300 $\mu\text{l/well}$ Waschpuffer gewaschen und nachfolgend mit 300 $\mu\text{l/well}$ *Reagent Diluent* für 1 h bei Raumtemperatur blockiert und wie oben beschrieben erneut gewaschen. Zu Beginn des ELISA wurde zuerst je 100 μl einer Standard-Verdünnungsreihe oder 100 μl der Zellkulturüberstände/*well* pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der ELISA für weitere 2 h bei RT mit je 100 μl Sekundärantikörper (*detection antibody*) inkubiert. Danach wurde der Waschschrift – wie schon beschrieben – wiederholt, je 100 μl Streptavidin-HRP pro *well* pipettiert und 20 min in Abwesenheit von Licht bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 $\mu\text{l/well}$ einer Entwicklerlösung hinzugegeben. Nach einer Inkubation von ca. 5 min wurde die Reaktion mit 50 μl Stopplösung (*stop solution*) pro *well* beendet. Die Zytokinkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 540 nm, um etwaige optische Fehler oder Mängel in der Platte zu korrigieren, im ELISA-Reader bestimmt.

2.2.3.4. IL-8-ELISA

Zur Bestimmung der IL-8-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurden zuerst 50 μl pro *well* des monoklonalen Primärantikörpers (*capture antibody*) in

einer Konzentration von 3 µg/ml in 0,1 M Na₂HPO₄ (pH 9) über Nacht bei + 4 °C in einer ELISA-Platte inkubiert. Durch viermaliges Waschen mit Waschpuffer (**Tab. 7**) wurden überschüssige Antikörper entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 200 µl/well Blockierungspuffer (**Tab. 7**) für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Nach Wiederholung des Waschschrilles - wie schon beschrieben - wurden 100 µl der Zellkulturüberstände je well pipettiert. Als Standardkurve wurden je 100 µl von rekombinatem humanem IL-8, verdünnt in Zellkulturmedium, in verschiedenen Konzentrationen (0; 5; 12; 25; 50; 100; 200; 400; 800 pg/ml) verwendet. Die Reaktion der in den Zellkulturüberständen befindlichen Zytokine mit den an der ELISA-Platte gebundenen Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei + 4 °C. Am nächsten Tag wurde erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers (0,5 µg/ml) erfolgte mit einem Volumen von 100 µl für 2 h bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen wurden je 50 µl Konjugat pro well pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrill wurde PNPP in Substratpuffer zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml aufgelöst und 50 µl pro well pipettiert. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C unter Lichtabschluss wurde die Zytokinkonzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einer Referenzwellenlänge von 490 nm, um etwaige optische Fehler oder Mängel in der Platte zu korrigieren, mit dem ELISA-Reader bestimmt.

2.2.4. Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Bei den in der Arbeit aufgeführten Daten handelt es sich um Mittelwerte aus repräsentativen Einzelversuche in Dreifachbestimmung. Bei den VEGF- und IL-8-ELISAs wurde jeweils eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mitbestimmt.

Die Datenbewertung erfolgte über den Student t-Test zur Prüfung der Gleichheit der Mittelwerte. Die Differenz von Werten mit $p < 0,05$ wurde als signifikant beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1. Adhärenz von *Bartonella quintana* an THP-1-Makrophagen im Vergleich zu *Bartonella henselae*

Von *Bartonella quintana* und *Bartonella henselae* ist bekannt, dass sie die Fähigkeit besitzen, an verschiedene Wirtszellen zu adhären und in ihnen zu persistieren, um sowohl infektiöse als auch vaskuloproliferative Erkrankungen, wie die bazilläre Angiomatose (BA) und Peliosis hepatis (PH), auszulösen. Insbesondere Zytokine, wie VEGF und IL-8, sind an der Entstehung der BA und der PH beteiligt (Kempf, Volkmann et al. 2001; McCord, Resto-Ruiz et al. 2006). In der Vergangenheit konnte für *B. henselae* gezeigt werden, dass die Sekretion von VEGF mit der Wirtszelladhärenz korreliert.

Um die Wirtszelladhärenz von *B. quintana* im Vergleich zu *B. henselae* zu analysieren, wurden humane Makrophagen mit *B. henselae* Marseille, *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München infiziert. Hierzu wurden zunächst THP-1-Monozyten – eine humane Monozytenzelllinie aus dem Blut eines einjährigen Jungen mit akuter Leukämie – durch 30-stündige Inkubation mit PMA zu Makrophagen differenziert. Nach Herstellung von Bakteriensuspensionen von *B. henselae* Marseille, *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München wurden die THP-1-Makrophagen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 100 infiziert. Nach Anzentrifugation der Zellkulturplatten wurde die Wirtszelladhärenz 30 Minuten nach Infektion durch Ausplattieren der Zellen auf Columbia-Blutagarplatten bestimmt.

Im Vergleich zu *B. henselae* Marseille (9,43% \pm 1,58% des Inokulum) zeigte sowohl *B. quintana* Toulouse (3,87% \pm 0,71% des Inokulum) als auch *B. quintana* München (1,08% \pm 0,27% des Inokulum) signifikant niedrigere Adhäsionsraten an THP-1-Makrophagen (**Abb. 7**).

Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München nach Infektion von THP-1-Makrophagen zudem auch eine verminderte Zytokin-Sekretion sowie Invasion und intrazelluläre Persistenz im Vergleich zu *B. henselae* Marseille aufweisen würden.

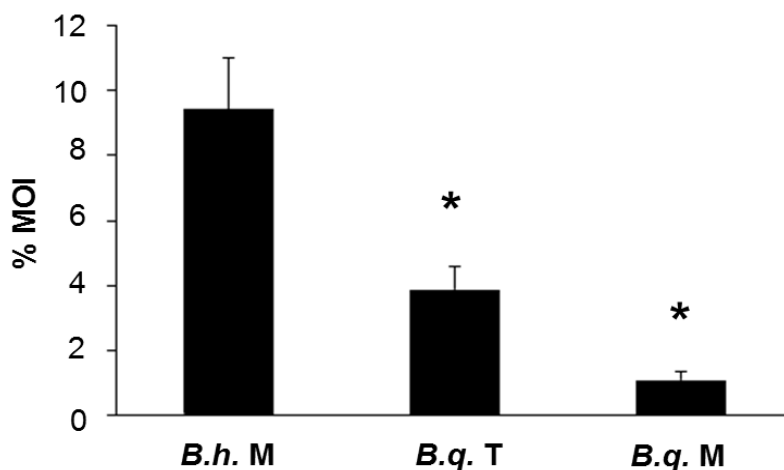


Abb. 7: Adhärenz von *B. henselae* Marseille (*B.h. M*), *B. quintana* Toulouse (*B.q. T*) und *B. quintana* München (*B.q. M*) an THP-1-Makrophagen. THP-1-Monozyten wurden durch Behandlung mit PMA zu Makrophagen differenziert.

Ein Sternchen zeigt an, dass der Wert signifikant niedriger gegenüber dem Wert ist, der mit *B. henselae* Marseille ($p < 0,05$) erhalten wurde.

3.2. Invasion und intrazelluläre Persistenz in THP-1-Makrophagen von *Bartonella quintana* im Vergleich zu *Bartonella henselae*

Zur Analyse der Invasion und intrazellulären Persistenz durch *Bartonella* spp. in THP-1-Makrophagen wurde die Anzahl an intrazellulären *B. henselae* Marseille, *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München unter Anwendung von *Gentamicin-protection-assays* untersucht und verglichen (**Abb. 8**).

Hierzu wurden erneut THP-1-Monozyten durch 30-stündige Inkubation mit PMA zu Makrophagen differenziert und Bakteriensuspensionen von *B. henselae* Marseille, *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München hergestellt.

Nachfolgend wurden die THP-1-Makrophagen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 100 infiziert. Nach Inkubation im Brutschrank über 1, 4, 24 und 48 h nach Infektion erfolgte die Inkubation der infizierten Zellen für 2 h mit Gentamicin und anschließendes Ausplattieren der Zellen auf Columbia-Blutagarplatten.

Nach 1 h war die Invasion durch *B. henselae* Marseille am größten (4,95 log₁₀CFU ± 0,13). Die Anzahl intrazellulärer Bakterien war mehr als 100-mal höher als für *B. quintana* Toulouse (2,92 log₁₀CFU ± 0,07) und *B. quintana* München (2,81 log₁₀CFU ± 0,04). Die Menge an intrazellulären *B. henselae* Marseille stieg bis 4 h nach Infektion an (5,57 log₁₀CFU ± 0,06) und nahm dann bis 48 h nach Infektion wieder leicht ab (5,06 log₁₀CFU ± 0,08).

Im Vergleich dazu, zeigten sich nach Infektion von THP-1-Makrophagen mit *B. quintana* Toulouse zu allen Zeitpunkten geringere Invasionsraten (1 h 2,92 log₁₀CFU ± 0,07; 4 h 3,02 log₁₀CFU ± 0,18; 24 h 2,72 log₁₀CFU ± 0,13; 48 h 2,78 log₁₀CFU ± 0,13). Nach Infektion mit *B. quintana* München zeigte sich ein verzögerter Anstieg an intrazellulären Erregern bis 48 h nach Infektion (1 h 2,81 log₁₀CFU ± 0,04; 4 h 2,69 log₁₀CFU ± 0,07; 24 h 3,44 log₁₀CFU ± 0,08; 48 h 5,44 log₁₀CFU ± 0,15). Die Daten zeigen, dass beide Subspezies auch noch 48 h nach Infektion von humanen Makrophagen intrazellulär nachweisbar sind. Die verwendeten *B. quintana*-Stämme Toulouse und München wiesen jedoch im Vergleich zu *B. henselae* Marseille deutlich geringere Invasionsraten auf (**Abb. 8**).

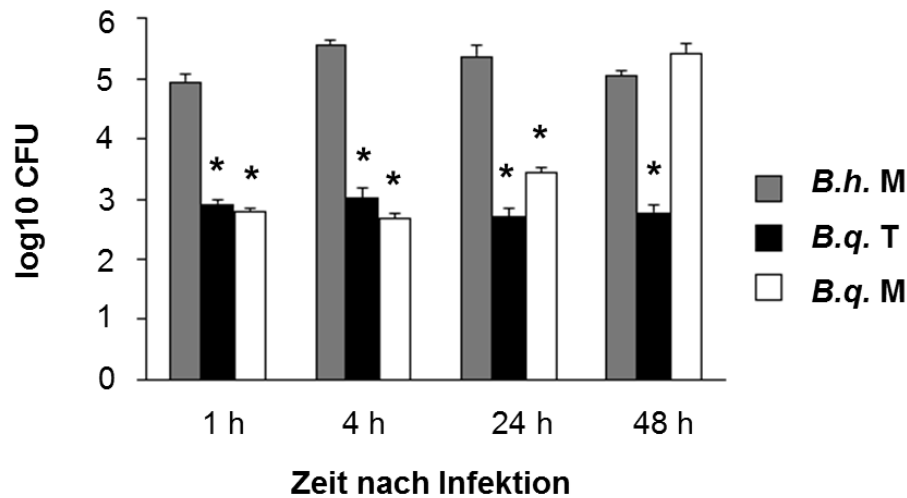


Abb. 8: Invasion und intrazelluläre Persistenz in THP-1-Makrophagen 1, 4, 24 und 48 h nach Infektion durch *B. henselae* Marseille (*B.h. M*), *B. quintana* Toulouse (*B.q. T*) und *B. quintana* München (*B.q. M*). THP-1-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät, durch Behandlung mit PMA zu Makrophagen differenziert und mit einer MOI von 100 infiziert. Die Invasion und intrazelluläre Persistenz wurden mittels *Gentamicin-protection-assays* bestimmt.

Ein Sternchen zeigt an, dass ein Wert signifikant gegenüber dem Wert ist, der mit *B. henselae* Marseille ($p < 0,05$) erhalten wurde.

3.3. Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort im Zellkulturmodell durch *Bartonella quintana* verglichen mit *Bartonella henselae*

Wie schon in der Vergangenheit gezeigt wurde, resultiert eine Infektion von Wirtszellen mit *Bartonella henselae* in einer gesteigerten Induktion der Zytokin-Sekretion. Sowohl das angioproliferativ wirksame Zytokin VEGF, dem eine Schlüsselrolle in der physiologischen und pathologischen Angiogenese zugeschrieben wird, als auch das angioproliferative und proinflammatorische Zytokin IL-8, wurden dabei von den Wirtszellen vermehrt sezerniert.

Aber auch Makrophagen kommt in der Entstehung von angioproliferativen Läsionen wie der bazillären Angiomatose eine wichtige Bedeutung zu.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Proliferationen der BA typischerweise von aktivierten Monozyten und Makrophagen infiltriert sind.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine gesteigerte Zytokin-Sekretion auch nachweisbar ist, wenn Wirtszellen mit *Bartonella quintana* infiziert werden.

3.3.1. Induktion der VEGF-Sekretion in THP-1-Makrophagen durch *Bartonella quintana*

Zum Nachweis der VEGF-Produktion wurden THP-1-Monozyten nach 30-stündiger Inkubation mit PMA zu Makrophagen differenziert, in Zellkulturplatten ausgesät und mit einer MOI von 100 mit *B. henselae* Marseille, *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München infiziert. Die Zellkulturüberstände wurden 48 h nach Infektion abgenommen und mittels ELISA vermessen.

Als Positivkontrolle diente PMA (25 ng/ml). Als Negativkontrolle wurde Infektionsmedium (Zellkulturmedium ohne FCS, Streptomycin und Penicillin; **Tab. 3**) verwendet.

Die Daten zeigen, dass die verwendeten *B. quintana*-Stämme im Vergleich zu *B. henselae* Marseille zu keiner VEGF-Sekretion führten (Kontrolle 232,56 pg/ml; *B. quintana* Toulouse 295,96 pg/ml; *B. quintana* München 284,08 pg/ml). *B. henselae* Marseille hingegen wies eine signifikante Induktion der VEGF-Produktion auf (646,82 pg/ml) (**Abb. 9**).

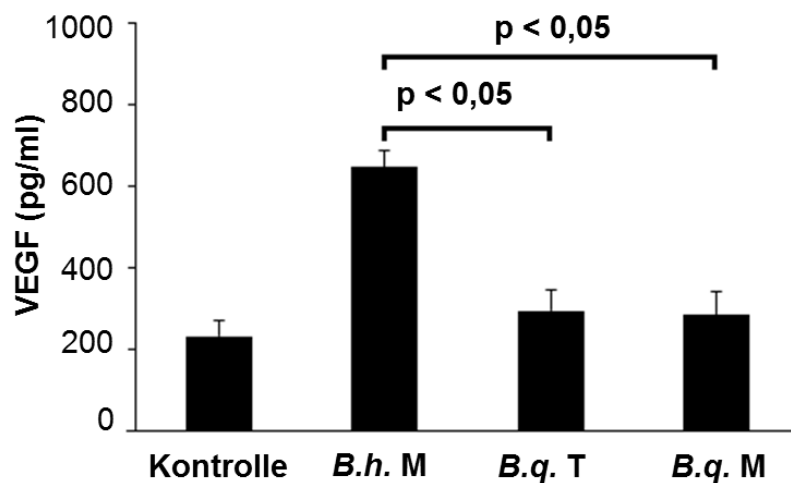


Abb. 9: VEGF-Sekretion von THP-1-Makrophagen nach Infektion mit *B. henselae* Marseille (*B.h. M*), *B. quintana* Toulouse (*B.q. T*) und *B. quintana* München (*B.q. M*). THP-1-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät, mit PMA zu Makrophagen differenziert und mit einer MOI von 100 infiziert. Die VEGF-Spiegel in den Zellkulturüberständen wurden nach Inkubation über 48 h mittels ELISA bestimmt. Die Kontrollzellen wurden nicht infiziert. Signifikante Unterschiede gegenüber den mit *B. henselae* Marseille erhaltenen Werten sind angezeigt ($p < 0,05$).

3.3.2. Induktion der IL-8-Sekretion in THP-1-Makrophagen durch *Bartonella quintana*

Ein weiteres Zytokin mit vaskuloproliferativen Fähigkeiten ist Interleukin-8 (IL-8). Zur Untersuchung der Induktion der IL-8-Produktion nach einer Infektion mit *Bartonella quintana* und *Bartonella henselae* wurden THP-1-Makrophagen mit einer MOI von 100 infiziert. Die THP-1-Monozyten wurden zuvor in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/well in Zellkulturplatten ausgesät und unter 30-stündiger Inkubation mit PMA (75 ng/well) zu Makrophagen differenziert.

Die Zellkulturüberstände wurden 24 h nach Infektion der Wirtszellen abgenommen und mittels ELISA vermessen. Als Positivkontrolle diente Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (50 ng/ml), das nachweislich zu einer Stimulation der IL-8-Produktion führt.

Als Negativkontrolle wurde Infektionsmedium (Zellkulturmedium ohne FCS, Streptomycin und Penicillin; **Tab. 3**) verwendet.

Die Daten zeigen, dass *B. henselae* Marseille zu einer deutlichen Induktion der IL-8-Sekretion in THP-1-Makrophagen führt (1303,47 pg/ml \pm 11,0). Beide *B. quintana*-Stämme wiesen hingegen eine signifikant niedrigere IL-8-Produktion auf (*B. quintana* Toulouse 456,5 pg/ml \pm 40,99; *B. quintana* München 679,59 pg/ml \pm 45,22). *B. quintana* München wies im Vergleich zu *B. quintana* Toulouse eine höhere Sekretion von Interleukin-8 auf, die im Vergleich zu *B. henselae* Marseille jedoch nicht signifikant war. (**Abb. 10**).

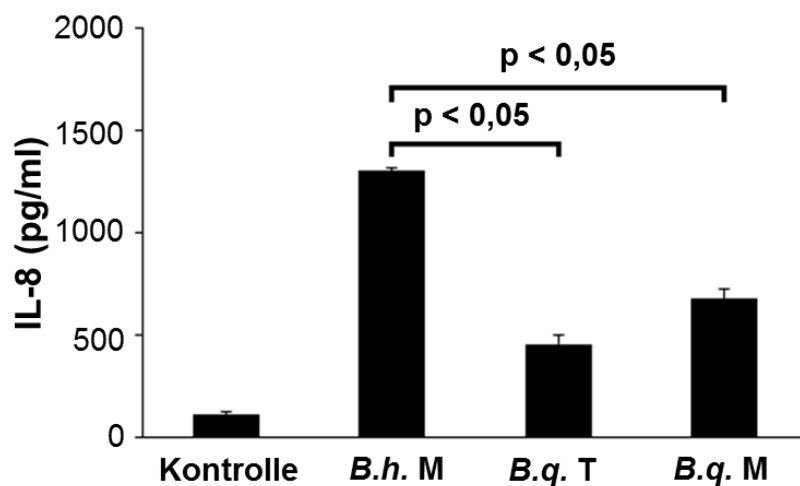


Abb. 10: IL-8-Sekretion von THP-1-Makrophagen nach Infektion mit *B. henselae* Marseille (*B.h. M*), *B. quintana* Toulouse (*B.q. T*) und *B. quintana* München (*B.q. M*). THP-1-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät, mit PMA differenziert und mit einer MOI von 100 infiziert. Die IL-8-Spiegel in den Zellkulturüberständen wurden nach Inkubation über 24 h mittels ELISA bestimmt. Die Kontrollzellen wurden nicht infiziert. Signifikante Unterschiede gegenüber den mit *B. henselae* Marseille erhaltenen Werten sind angezeigt ($p < 0,05$).

3.3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend zeigt sich in den Versuchen dieser Dissertation, dass die verwendeten Stämme von *B. quintana* – *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München – im Vergleich zu *B. henselae* Marseille nicht nur eine signifikant geringere Adhärenz an humane THP-1-Makrophagen aufweisen, sondern auch eine deutlich verminderte Invasion und intrazelluläre Persistenz 1, 4 und 24 h nach Infektion. Während *B. quintana* Toulouse zu allen Zeitpunkten nach Infektion nur geringe Invasionsraten aufwies, fand sich 48 h nach Infektion von humanen Makrophagen mit *B. quintana* München ein verzögerter Anstieg an intrazellulären Erregern, vergleichbar dem von *B. henselae* Marseille.

Im Hinblick auf die Induktion der Zytokin-Sekretion fanden sich sowohl für VEGF als auch Interleukin-8 nach Infektion von THP-1-Makrophagen durch *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München im Vergleich zu *B. henselae* Marseille signifikant geringere Zytokin-Spiegel.

4. Diskussion

Bartonella quintana wird von der humanen Körperlaus übertragen und löst beim Menschen Erkrankungen wie das Fünf-Tage-Fieber, Bakteriämien und Endokarditiden aus (Maurin and Raoult 1996; Anderson and Neuman 1997).

Von *Bartonella* spp. ist bekannt, dass es in der Lage ist in verschiedene Zellen zu invadieren und in ihnen zu persistieren. Neben Erythrozyten (Kordick and Breitschwerdt 1995; Mehock, Greene et al. 1998) können auch Endothelzellen (Hill, Raji et al. 1992; Dehio, Meyer et al. 1997), Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (Musso, Badolato et al. 2001; Resto-Ruiz, Schmiederer et al. 2002; Schulte, Linke et al. 2006; Vermi, Facchetti et al. 2006) kolonisiert werden (Eicher and Dehio 2012). Die Fähigkeit in Wirtszellen zu invadieren und in ihnen zu persistieren trägt essentiell zu den für *Bartonella* spp. charakteristischen prolongierten Bakteriämien sowie schwerwiegenden Krankheitsverläufen insbesondere bei immunsupprimierten Patienten bei.

Eine weitere faszinierende Eigenschaft der Gattung *Bartonella* ist die Fähigkeit, vaskuloproliferative Läsionen, wie beispielsweise die bazilläre Angiomatose oder Peliosis hepatis, auszulösen (Garcia, Wojta et al. 1990; Koehler, Sanchez et al. 1997; Jacomo, Kelly et al. 2002). Dieses angiogenetische Potential ist von besonderem Interesse, um die Mechanismen, die der bakteriell induzierten Tumorbildung zugrunde liegen, besser zu verstehen. Das Wachstum solider Tumoren ist von der Ausbildung eines feinen Netzwerkes von Blutgefäßen abhängig und beruht auf einem ausgewogenen Gleichgewicht stimulierender und hemmender Regulatoren der Angiogenese. Ohne die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch neue Blutgefäße wären Tumoren nicht in der Lage, über eine kritische Größe zu wachsen oder in andere Organe zu metastasieren. Einige Mechanismen, die den Vaskuloproliferationen bei einer *B. henselae*-Infektion zugrunde liegen (z.B. direkte Stimulation endothelialer Proliferation (Conley, Slater et al. 1994), Hemmung der endothelialen Zellapoptose (Kirby and Nekorchuk 2002; Schmid, Schulein et al. 2004),

Aktivierung von *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) und die nachfolgende Sekretion von VEGF (Kempf, Volkmann et al. 2001; Resto-Ruiz, Schmiederer et al. 2002; Kempf, Lebidziejewski et al. 2005; Kyme, Haas et al. 2005)) wurden in der Vergangenheit aufgezeigt. Ob der Induktion von vaskuloproliferativen Läsionen durch *B. quintana* vergleichbare Pathogenitätsmechanismen zu Grunde liegen, ist jedoch noch weitgehend unklar.

4.1. Pathogenese von *Bartonella* spp.-induzierten Vaskuloproliferationen: die Rolle von Zytokinen und Makrophagen

Von Zytokinen, wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und IL-8 (Interleukin-8), weiß man, dass sie für die pathologische Angiogenese (z.B. Entstehung von Tumoren, diabetische Retinopathie) von entscheidender Bedeutung sind (Yancopoulos, Davis et al. 2000). In der Pathogenese von *Bartonella* spp.-induzierten Läsionen wie der BA und PH spielt insbesondere die Proliferation von Endothelzellen durch VEGF eine entscheidende Rolle. Die Zytokine regen Endothelzellen zur Migration und zum Wachstum an und fördern so die Angiogenese. Aber auch Makrophagen nehmen in der pathologischen Angiogenese eine zentrale Stellung ein (Kempf, Schairer et al. 2005). Die Proliferationen der bazillären Angiomatose sind typischerweise von aktivierten Monozyten und Makrophagen infiltriert (LeBoit, Berger et al. 1989; Monteil, Michiels et al. 1994). Eine Infektion durch *B. henselae* regt diese Zellen zur Sekretion von angiogenetischen Zytokinen (Resto-Ruiz, Schmiederer et al. 2002; Kempf, Schairer et al. 2005; Kyme, Haas et al. 2005), wie beispielsweise VEGF, Interleukin-8, *basic fibroblast growth factor* (bFGF), Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Madtes, Raines et al. 1988; Koch, Poverini et al. 1992; Haraguchi, Miyadera et al. 1994) an und hemmt zudem die Apoptose, was wiederum zu einer verlängerten VEGF-Sekretion durch die Zellen führt und sich somit positiv auf die Tumorentstehung auswirkt.

Auch die Proliferation von Endothelzellen scheint indirekt von der Aktivierung von Makrophagen abzuhängen.

Als ein wichtiger Pathogenitätsmechanismus von *B. henselae* wurde in diesem Zusammenhang das zweistufige „*paracrine loop model*“ beschrieben. Entsprechend diesem hypothetischen Modell, sind die endothelialen Proliferationen, die den vaskuloproliferativen Erkrankungen BA und PH zugrunde liegen, nicht das Resultat einer direkten Wirkung der Bakterien auf die Endothelzellen, sondern das Ergebnis einer Erreger-induzierten VEGF-Produktion der umliegenden Makrophagen und Epithelzellen. Auch Studien mit *Bartonella bacilliformis* bestätigen diese Hypothese (Verma, Davis et al. 2001; Kempf, Hitziger et al. 2002; Volkmann 2004; Kempf, Lebidziejewski et al. 2005; Kyme, Haas et al. 2005).

Da in der Vergangenheit gezeigt wurde, dass *B. quintana* ein genetischer Abkömmling von *B. henselae* ist (Alsmark, Frank et al. 2004), liegt die Vermutung nahe, dass die beiden Pathogene ähnliche Pathogenitätsstrategien teilen.

4.2. Mechanismus der Bakterien-Wirtszell-Interaktion: ein Vergleich zwischen *Bartonella quintana* und *Bartonella henselae*

4.2.1. Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort durch *Bartonella quintana*

Obwohl auch von *Bartonella quintana* bekannt ist, dass es Vaskuloproliferationen, wie die BA und PH beim Menschen auslösen kann, ergaben die Versuche dieser Arbeit deutliche Unterschiede in der Zytokin-Sekretion zwischen den verwendeten *B. quintana*-Stämmen (*B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München) und *B. henselae* Marseille. Nach Infektion von THP-1-Makrophagen mit *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München konnte keine wesentliche Induktion der VEGF-Sekretion und nur eine geringe IL-8-Sekretion in den Zellkulturüberständen im Vergleich zu den Versuchen mit *B. henselae* Marseille nachgewiesen werden.

Von *B. henselae* weiß man, dass die Expression des nicht-fimbriellen Adhäsins BadA von entscheidender Bedeutung für die Induktion der VEGF- und IL-8-Sekretion ist (Riess, Andersson et al. 2004). Obwohl BadA⁻ - *B. henselae* drei Tage nach Infektion eine vergleichbare intrazelluläre Persistenz wie der BadA⁺ - Stamm aufwies, konnte dennoch nur eine sehr geringe VEGF-Produktion nachgewiesen werden. Gensequenzanalysen von Oberflächenproteinen von *B. quintana* (Vomps, *variably expressed outer membrane proteins*) (Zhang, Chomel et al. 2004) zeigten, dass die Vomp-Proteine TAAs (*trimeric autotransporter adhesins*) sind, die BadA von *B. henselae* und BrpA von *B. vinsonii* sehr ähnlich sind (Linke, Riess et al. 2006). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die Strukturen, die ursprünglich als „Pili“ in *Bartonella* spp. (Batterman, Peek et al. 1995) bezeichnet wurden, in *B. quintana* durch die Vomps repräsentiert werden.

Von VompA-C weiß man, dass sie für die Induktion der VEGF-Sekretion in humanen Epithelzellen (HeLa 229-Zellen) und Makrophagen (THP-1-Zellen) von Bedeutung sind (Schulte, Linke et al. 2006). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Vomp-Expression bei verschiedenen *B. quintana*-Stämmen variiert. Vomps konnten auf der Oberfläche von *B. quintana* JK-31, aber nicht auf der Oberfläche von *B. quintana* 2-D70, *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München nachgewiesen werden (Schulte, Linke et al. 2006). In Studien konnte gezeigt werden, dass *Bartonella*-Infektionen nur in einer signifikanten Erhöhung der VEGF-Sekretion durch humane Makrophagen (THP-1-Zellen) und Epithelzellen (HeLa 229-Zellen) resultierten, wenn die Wirtszellen mit Vomp-exprimierenden *Bartonella*-Stämmen (*B. quintana* JK-31 und *B. henselae* Marseille) infiziert wurden. Stämme, denen eine Vomp-Expression fehlte (*B. quintana* 2-D70, *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München), waren signifikant weniger in der Lage, eine VEGF-Sekretion zu induzieren (Schulte, Linke et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse wurden für BadA⁻ - *B. henselae* beschrieben (Riess, Andersson et al. 2004).

Die Ergebnisse dieser Dissertation stimmen somit mit den veröffentlichten Daten überein (Batterman, Peek et al. 1995; Schulte, Linke et al. 2006).

Bedauerlicherweise lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht sicher erklären, warum die in dieser Dissertation verwendeten Stämme von *B. quintana* (*B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München) keine Vomp-Expression aufwiesen. Es wurde berichtet, dass das wiederholte Passagieren von *B. quintana* JK-31 (passagiert für 70 Tage, resultierend in 2-D70-Isolaten) in einem Verlust der Vomp-Expression resultiert.

Es ist anzumerken, dass die Versuche dieser Arbeit zur Pathogenität von *B. quintana* unter Verwendung von Bakterien durchgeführt wurde, die eine ungenaue oder große (> 100 Passagen) Anzahl an Passagen durchlaufen haben (Liberto, Matera et al. 2003; Meghari, Rolain et al. 2006), aber nicht auf eine Vomp-Expression untersucht wurden.

Aus diesen Daten ergibt sich die Vermutung, dass das zuvor beschriebene proangiogenetische Genprogramm, welches durch *B. henselae* ausgelöst wird, beobachtet werden kann, wenn Zellen mit dem Vomp-exprimierenden *B. quintana* JK-31-Stamm infiziert werden, aber nicht, wenn Zellen mit *B. quintana* 2-D70, *B. quintana* Toulouse oder *B. quintana* München infiziert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass bakterielle Oberflächenproteine (OMPs) auch bei Infektionen mit *B. quintana* eine wichtige Rolle in der Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort spielen (Schulte, Linke et al. 2006).

Dass die mit *B. quintana*-infizierten Makrophagen nur eine geringe, aber doch messbare IL-8-Sekretion aufwiesen, kann möglicherweise durch einen Vomp- / BadA-unabhängigen Mechanismus erklärt werden.

Zum Beispiel, konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass *outer membrane protein fractions* und das VirB/VirD4 Typ IV Sekretions-System von *B. henselae*, die für die Inhibition der Apoptose wichtig sind, zusätzlich an der IL-8-Sekretion Beteiligung haben (Schmid, Schulein et al. 2004). Diese Faktoren könnten auch bei einer Infektion durch *B. quintana* eine Rolle spielen.

4.2.2. *Bartonella quintana* zeigt eine deutlich verminderte Adhärenz an THP-1-Zellen im Vergleich zu *Bartonella henselae*

Von *Bartonella* spp. weiß man, dass es in verschiedene Wirtszellen, wie beispielsweise Erythrozyten und Endothelzellen, aber auch Makrophagen und Monozyten, invadieren kann (Eicher and Dehio 2012). Die initialen Schritte einer Infektion und Invasion von Wirtszellen werden durch die Adhärenz des Pathogens an die extrazelluläre Matrix (ECM) und die Zellmembran der Wirtszelle gestaltet. Solche Interaktionen involvieren Oberflächenproteine, die den Kontakt zwischen Bakterium und Oberfläche der Wirtszelle vermitteln (Eicher and Dehio 2012). Diese Aufgaben sind primär Pilus-ähnlichen Anhängen auf der Bakterienoberfläche vorbehalten, die für *B. henselae* initial irrtümlicherweise als „Typ IV-Pili“ beschrieben (Batterman, Peek et al. 1995), später aber als *trimeric autotransporter adhesins* (TAAs) indentifiziert wurden (Riess, Andersson et al. 2004). Von dem TAA *Bartonella* Adhesin A (BadA) von *B. henselae* weiß man, dass es die bakterielle Adhärenz an Wirtszellen über β 1-Integrine und extrazelluläre Matrixproteine vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass ein durch Transposon-Mutagenese hergestellter Klon von *B. henselae*, der BadA nicht exprimiert (BadA⁻) weniger effektiv an Kollagen I, III und IV sowie an Laminin und Fibronectin bindet, was zu einer deutlich abgeschwächten Adhärenz führt (Riess, Andersson et al. 2004).

Auch die von *B. quintana* exprimierten *variably expressed outer membrane proteins* (Vomps) gehören zur Familie der TAAs (Muller, Kaiser et al. 2011). Man weiß, dass Vomps an der Autoagglutination und Bindung an die extrazelluläre Matrix (ECM) beteiligt sind (Zhang, Chomel et al. 2004), aber keine signifikante Bedeutung für die Adhärenz an humane Epithelzellen (HeLa 229-Zellen) und Makrophagen (THP-1-Zellen) aufweisen (Schulte, Linke et al. 2006). Unter anderen Untersuchungsbedingungen – durch Infektion von Endothelzellen - konnte jedoch gezeigt werden, dass die Adhärenz an diese Wirtszellen eindeutig von der Vomp-Expression abhängig war.

Es ist daher zu vermuten, dass die Bindung von *B. quintana* an Endothelzellen – nicht aber an Epithelzellen oder Makrophagen - durch VompA-C vermittelt wird, obwohl direkter experimenteller Beweis für diese Hypothese fehlt (Muller, Kaiser et al. 2011). Der Grund für die unterschiedlich exprimierten Phänotypen von *B. quintana* im Hinblick auf die Adhärenz an endotheliale und epitheliale Zellen sowie Makrophagen bleibt unklar, könnte aber durch einen spezifischen Bindungspartner, der nur auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird, erklärt werden (Muller, Kaiser et al. 2011).

Die Ergebnisse dieser Dissertation stimmen hiermit überein, da die Versuche mit Vomp⁻ - Stämmen von *B. quintana* (*B. quintana* München und *B. quintana* Toulouse) und humanen Makrophagen durchgeführt wurden und im Vergleich zu den Versuchen mit dem BadA⁺ - *B. henselae* Marseille eine signifikant verminderte Wirtszelladhärenz aufwiesen.

Zukünftig sind weitere Versuche mit Vomp-exprimierenden Stämmen von *B. quintana* sowie Vomp⁻ - *B. quintana*-Stämmen mit verschiedenen Wirtszelltypen, wie beispielweise Endothel- und Epithelzellen sowie Makrophagen, notwendig, um pathogenabhängige und wirtszelltypabhängige Faktoren, die für die Wirtszelladhärenz eine Rolle spielen, näher zu beleuchten.

4.2.2.1. Zusammenhang zwischen Wirtszelladhärenz und Induktion der Zytokin-Sekretion

Für *Bartonella henselae* konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Induktion der VEGF-Sekretion ein Prozess ist, der durch die an Wirtszellen adhärenenten Erreger vermittelt wird (Riess, Andersson et al. 2004). Im Umkehrschluss konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Adhärenz an Wirtszellen zu niedrigeren VEGF-Spiegeln im Zellkulturüberstand sowie auch niedrigeren Invasionsraten führt. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass der initiale Bakterien-Wirtszell-Kontakt, der am Beispiel von *B. henselae* durch BadA vermittelt wird, für den Prozess der Wirtszelladhärenz und somit auch die VEGF-Produktion ausschlaggebend ist.

Die in den Versuchen dieser Dissertation erhaltenen Ergebnisse im Hinblick auf den Zusammenhang der Wirtszelladhärenz und Zytokin-Sekretion stimmen hiermit überein.

Die verwendeten Stämme von *B. quintana* (*B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München), die keine Vomp-Expression aufweisen, zeigten im Vergleich zu *B. henselae* Marseille sowohl eine signifikant verminderte Adhärenz an THP-1-Makrophagen als auch eine signifikant niedrigere Sekretion von Interleukin-8 und keine VEGF-Sekretion, wohingegen *B. henselae* Marseille eine signifikante Induktion der VEGF-Sekretion aufwies.

Überraschenderweise scheint diese Beziehung bei einer Infektion mit dem Vomp-exprimierenden *B. quintana* JK-31 nicht so offensichtlich zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Level der Adhärenz von allen verwendeten *B. quintana*-Stämmen (*B. henselae* Marseille, *B. quintana* JK-31, *B. quintana* 2-D70 (Vomp⁻), *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München) signifikant niedriger als die Level der Adhärenz von *B. henselae* Marseille waren. Warum der Vomp-exprimierende *B. quintana* JK-31, bei gleichzeitig signifikant niedrigerer Adhärenz, dennoch zu einer starken Induktion der VEGF-Sekretion führte, ähnlich der Induktion, die mit *B. henselae* erzielt wurde, bleibt unklar (Schulte, Linke et al. 2006). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Adhärenz an Wirtszellen über Vombs bei *B. quintana* JK-31 ein vorübergehendes Phänomen darstellt und dass, im Gegensatz dazu, bei *B. henselae*-Infektionen die Adhärenz stärker und länger anhaltend ist.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass im Gegensatz zu BadA von *B. henselae* bei den Vombs von *B. quintana* keine so eindeutige Beziehung zwischen Adhärenz und Induktion der VEGF-Sekretion besteht. Es ist zu vermuten, dass weitere Pathogenitätsfaktoren – abgesehen von den Vombs – in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Leider gibt es zum aktuellen Zeitpunkt hierzu keine Daten.

Eine weitere Rolle sowohl im Hinblick auf die Wirtszelladhärenz als auch die Zytokin-Sekretion scheint zudem der durch *Bartonella* spp.-infizierte Zelltyp zu spielen, da in Studien mit Endothelzellen zwar eine Vomp-abhängige Adhärenz nachgewiesen werden konnte, in Studien mit Epithelzellen und Makrophagen hingegen jedoch nicht (Muller, Kaiser et al. 2011).

Die Charakterisierung von Vomp-Rezeptoren auf Wirtszelloberflächen würde sicherlich interessante Daten liefern, da Vomps scheinbar auf unterschiedliche Weise in den Parasitismus von verschiedenen Wirtszelltypen involviert sind (Kaiser, Riess et al. 2008).

4.2.3. Invasion von *Bartonella quintana* in THP-1-Makrophagen im Vergleich zu *Bartonella henselae*

Bartonella spp. ist eine Gattung fakultativ intrazellulär wachsender Bakterien, die typischerweise prolongierte intraerythrozytäre Bakteriämien auslöst, die die weitere Übertragung des Pathogens durch blutsaugende Arthropoden begünstigen. In den meisten Fällen verlaufen die durch *Bartonella* spp. verursachten Infektionen subklinisch und die intraerythrozytäre Bakteriämie kann Wochen, Monate und sogar Jahre andauern (Eicher and Dehio 2012; Pulliainen and Dehio 2012).

Der Aufnahmeprozess von *Bartonella* spp. in die Wirtszelle wurde bisher am besten für *B. henselae* mit Endothelzellen untersucht. Nach initialem Eindringen in Endothelzellen kann *B. henselae* in *Bartonella*-enthaltenden Vakuolen nachgewiesen werden. Jede dieser Vakuolen enthält ein einzelnes oder ein paar wenige Bakterien. Dieser Prozess kann jedoch durch die Injektion von *Bartonella effector proteins* (Beps) aufgehalten werden, was vermutlich zu einer Akkumulation von extrazellulären Bakterien auf der Plasmamembran der Wirtszelle führt. Dieses Konglomerat wird letztlich in einem sogenannten Invasom in die Wirtszelle aufgenommen (Eicher and Dehio 2012). Nach Aufnahme in die Wirtszelle konnte *B. henselae* intrazellulär bislang ausschließlich in Vakuolen, aber nicht im Zytosol nachgewiesen

werden (Kempf, Schaller et al. 2000). Der genaue Verbleib des Pathogens in der Wirtszelle muss jedoch noch nachgewiesen werden.

Auch von *B. quintana* weiß man, dass es in perinukleären Vakuolen verbleibt (Schulte, Linke et al. 2006). Die Mechanismen, die dieser Fähigkeit zugrunde liegen, bedürfen jedoch noch weiterer Untersuchungen.

Wie schon in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, wird eine erhöhte Adhärenz von *Bartonella henselae* Marseille an Wirtszellen auch von größeren Invasionsraten und einer größeren Anzahl an intrazellulären Bakterien begleitet. In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Dissertation konnte im Umkehrschluss gezeigt werden, dass eine verminderte Wirtszelladhärenz der verwendeten *B. quintana*-Stämme auch mit verminderten Invasionsraten einhergeht.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch schon in anderen Studien mit *B. quintana* beschrieben, die jedoch mit humanen Epithelzellen durchgeführt wurden (Liberto, Matera et al. 2003).

Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass Pathogenitätsmechanismen, die in der Vermittlung der Wirtszelladhärenz eine Rolle spielen, wie beispielsweise bakterielle Oberflächenproteine, auch für die Invasion und intrazelluläre Persistenz von *B. quintana* von Bedeutung sind.

In Versuchen mit verschiedenen *B. quintana*-Stämmen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an intrazellulären *B. quintana* JK-31 (Vomp⁺) und *B. quintana* 2-D70 (Vomp⁻) zwar im ähnlichen Bereich lagen, wie die Anzahl an *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München. Jedoch waren die Invasionsraten des Vomp-exprimierenden Stammes *B. quintana* JK-31 zu allen Zeitpunkten der Infektion (1 h, 4 h, 24 h und 48 h) deutlich höher als die Invasionsraten für das Vomp⁻ - 2-D70-Isolat (Schulte, Linke et al. 2006).

Wie schon erwähnt wurde, resultiert das wiederholte Passagieren von *B. henselae* in einem Verlust der BadA-Expression (Batterman, Peek et al. 1995; Kempf, Volkmann et al. 2001; Kyme, Dillon et al. 2003). Das Fehlen der BadA-Expression eines *B. henselae*-Stammes korreliert mit einer 8.5-kb-Deletion

im *badA*-Gencluster (Riess, Andersson et al. 2004). Ebenso konnte die Deletion von *VompA* und *VompB* im *vomp*-Gencluster von *B. quintana* 2-D70 beschrieben werden (Zhang, Chomel et al. 2004). Aus diesem Grund kann gemutmaßt werden, dass zumindest die *B. quintana* Toulouse- und *B. quintana* München-Stämme, die in dieser Dissertation verwendet wurden, einige Passagen auf solidem Medium erfahren haben - vermutlich bevor sie eingefroren wurden - und in einem Verlust der *Vomp*-Expression durch Rekombinationen mündete, was mutmaßlich für die vermindert virulenten *in vitro*-Phänotypen verantwortlich war.

4.2.4. Intrazelluläre Persistenz und Proliferation von *Bartonella quintana* in humanen Makrophagen

Während körpereigene Abwehrmechanismen nach Infektion durch ein Pathogen die Aufgabe haben, den Schaden für den Wirtsorganismus so gering wie möglich zu halten, versucht das Pathogen hingegen der Wirtszellabwehr zu entkommen, um sich verbreiten und vermehren zu können. Um intrazellulär in Wirtszellen überleben zu können, sind bedeutsame Anpassungsstrategien des Erregers notwendig, um mit einer langen Liste an Stressoren fertig zu werden, wie beispielweise reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), pH-Wert-Veränderungen und Schwankungen der Osmolarität (Minnick and Battisti 2009).

Da *Bartonella* spp. eine ausgeprägt lange Generationszeit hat, ist der Erreger theoretisch ausgesprochen anfällig für eine rasche Elimination durch die Wirtszellabwehr. Trotz dieser Vulnerabilität sind *Bartonella quintana* und *Bartonella henselae* in der Lage chronische Bakteriämien zu verursachen, die Monate bis Jahre andauern (Maurin and Raoult 1996; Karem, Paddock et al. 2000). Die Gattung *Bartonella* besitzt Verteidigungsstrategien, um die Wirtszellabwehr zu umgehen und sich zusätzlich optimierte Bedingungen zu schaffen, um sein Überleben zu sichern. In Versuchen mit durch *B. henselae* infizierten Endothelzellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Erreger in die Wirtszelle invadiert (Kirby and Nekorchuk 2002) und diese vor

dem Immunsystem geschützte intrazelluläre Nische zur Replikation benutzt (Kempf, Schaller et al. 2000). Die infizierten Wirtszellen ihrerseits proliferieren schneller (Conley, Slater et al. 1994) und bleiben länger viabel (Koehler, Quinn et al. 1992), wodurch wiederum der Erreger seine eigenen Lebensbedingungen optimiert, um sein Überleben zu sichern. Vergleichbare Ergebnisse wurden in Versuchen mit durch *B. henselae* infizierte humane und murine Makrophagen und Monozyten (Kempf, Schairer et al. 2005) erhalten.

Ein gemeinsamer Abwehrmechanismus gegen intrazellulären Parasitismus ist die Elimination von infizierten Zellen durch Induktion der Apoptose (Roulston, Marcellus et al. 1999; Weinrauch and Zychlinsky 1999; Kirby and Nekorchuk 2002). Pathogen-getriggerte antiapoptotische Strategien wurden schon in der Vergangenheit als wichtiger Virulenzfaktor von Bakterien identifiziert, die vorwiegend chronische Infektionen verursachen (z.B. *Bartonella* spp., *Brucella* spp., *Chlamydia* spp., *Helicobacter* spp., *Mycobacterium* spp. und *Rickettsia* spp.) (Schmid, Scheidegger et al. 2006). Auf diese Weise – durch Inhibition der Apoptose - schützen diese Pathogene ihren intrazellulären Lebensraum und sichern ihr Überleben (Zigangirova and Gintsburg 2004).

Im Falle von *B. henselae* und *B. quintana* konnte gezeigt werden, dass die Bildung von vaskuloproliferativen Tumoren bei immunsupprimierten Patienten, mit der Inhibition der Apoptose von infizierten Endothelzellen vergesellschaftet ist (Kirby and Nekorchuk 2002). Es konnte gezeigt werden, dass BepA (*Bartonella effector protein A*) eine entscheidende Rolle für die Inhibition der Wirtszellapoptose spielt, da der Verlust des bepA-Gens in einem kompletten Verlust der antiapoptotischen Aktivität des Erregers resultiert (Schmid, Scheidegger et al. 2006).

In Versuchen mit *B. henselae* und Mono Mac 6-Zellen konnte gezeigt werden, dass das Pathogen die Fähigkeit besitzt, das „endogene Suizidprogramm“ dieser Zellen zu inhibieren. Der antiapoptotische Effekt von *B. henselae* wurde durch die Aktivierung des Transkriptionssfaktors NF- κ B, die Induktion von *cellular inhibitor of apoptosis protein-1* und *-2* (cIAP-1, -2) begleitet

(Kempf, Schairer et al. 2005). Hieraus ergeben sich weitere Hinweise darauf, dass *B. henselae* sein intrazelluläres Überleben über eine Inhibition der Wirtszellapoptose sichert.

Obwohl die Bedeutung der Vomps (VompA-C) von *B. quintana* für die Wirtszelladhärenz noch nicht hinreichend verstanden ist, scheint ihre Expression dennoch wesentlich an der Etablierung chronischer Bakteriämien beteiligt zu sein, was an einem Tiermodell mit Rhesusaffen gezeigt werden konnte (Schmid, Scheidegger et al. 2006; MacKichan, Gerns et al. 2008). Die Herstellung eines Vomp⁻ - *B. quintana* (fehlende Expression aller vier Vomps) resultierte in einem avirulenten Stamm, der nicht in der Lage war, eine Bakteriämie zu verursachen (MacKichan, Gerns et al. 2008).

Über die Fähigkeit hinaus intrazellulär zu persistieren, konnten in Versuchen mit *B. henselae* sogar Hinweise auf eine intrazelluläre Vermehrung des Pathogens gefunden werden. 30 Minuten nach Infektion mit *B. henselae* konnte ein starker Anstieg von bakterieller rRNA nachgewiesen werden, der auf eine intrazelluläre Vermehrung des Pathogens schließen lässt. Auch an Wirtszellen adhärente Bakterien zeigten einen rRNA-Anstieg. Diese Ergebnisse konnten auch mit HUVECs, Vero- und HeLa-Zellen erzielt werden, was darauf hindeutet, dass der Anstieg von bakterieller rRNA nicht von einem spezifischen Zelltyp anhängig ist (Kempf, Schaller et al. 2000).

In den Infektionsversuchen dieser Arbeit (*Gentamicin-protection-assays*) zeigten sowohl die verwendeten *B. quintana*-Stämme (*B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München) als auch *B. henselae* Marseille noch nach 48 h eine intrazelluläre Persistenz in humanen Makrophagen. *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München wiesen im Vergleich zu *B. henselae* Marseille jedoch deutlich verminderte Invasionsraten auf. Für *B. quintana* Toulouse wurden insgesamt sehr geringe Level an intrazellulären Bakterien erhalten.

Erstaunlicherweise zeigte sich nach Infektion mit *B. quintana* München jedoch ein verzögerter Anstieg an intrazellulären Erregern.

Bei initial geringen Invasionsraten - vergleichbar denen von *B. quintana* Toulouse - waren nach 48 h schließlich deutlich höhere Invasionsraten - vergleichbar denen von *B. henselae* Marseille – zu verzeichnen.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass auch *B. quintana* über Pathogenitätsmechanismen verfügt, die es dem Erreger durch Umgehung von Abwehrmechanismen ermöglichen, nicht nur intrazellulär in Wirtszellen zu überleben sondern sich darüberhinaus sogar in Wirtszellen vermehren zu können. Welche Pathogenitätsstrategien für die intrazelluläre Persistenz und Vermehrung von *B. quintana* in Wirtszellen eine entscheidende Rolle spielen, muss jedoch weiter untersucht werden.

Die Antigenvariation, beispielsweise, gehört zu den erfolgreichsten Strategien von Pathogenen, um in einem Wirt zu persistieren (Borst 1991; Barbour and Restrepo 2000). Pathogene Mikroorganismen haben die Fähigkeit antigene Determinanten innerhalb ihrer Oberflächenmoleküle zu verändern, um so der Abwehr durch das Immunsystem des Wirtes auszuweichen, das heißt der adaptiven Immunreaktion zu entgehen. Beispiele sind Antigendrift und Antigen shift bei Influenzaviren und die Veränderungen des Oberflächenproteins gp 120 bei HIV. Im Tiermodell konnten Veränderungen der bakteriellen Oberflächenproteine (OMP) während einer prolongierten Bakteriämie nach *B. quintana*-Infektion nachgewiesen werden (Zhang, Chomel et al. 2004). Die wechselnde Expression von Mitgliedern der Vomp-Familie scheint durch die Deletion von einem oder mehreren vomp-Genen während chronischer Bakteriämie vermittelt zu sein (MacKichan, Gerns et al. 2008). Vomp-Deletion konnte auch in Isolaten von Menschen mit chronischer Bakteriämie während einer *B. quintana*-Infektion beobachtet werden.

Zusammenfassend scheinen sowohl in der Etablierung von chronischen Bakteriämien als auch in der Entstehung von vaskuloproliferativen Läsionen antiapoptotische Mechanismen von *Bartonella* spp. eine Rolle zu spielen.

Zudem scheint neben der zellulären auch die humorale Immunität notwendig zu sein, um *Bartonella* spp. vollständig aus einem Wirt zu entfernen, da das Pathogen einer solchen Immunantwort offensichtlich aktiv entgegenwirkt (Harms and Dehio 2012).

4.2.5. Interaktion zwischen *Bartonella* spp. und humanen Makrophagen

Vor allem die Fähigkeit der Makrophagen zur Phagozytose spielt im Rahmen akuter Infektionen eine zentrale Rolle für die schnelle Bekämpfung von Pathogenen. Insbesondere die Reifung des Phagosoms sowie die Fusion mit den Lysosomen zum Phagolysosom sind fundamentale Bestandteile zur Kontrolle von intrazellulären Pathogenen.

Nachdem *Bartonella* spp. in Invasomen oder *Bartonella*-enthaltenden Vakuolen (BCV) in die Wirtszelle aufgenommen wurde, verbleibt es im perinukleären Raum. Es erfolgt weder eine Ansäuerung der BCVs durch Absenkung des pH-Wertes noch verschmelzen diese mit Lysosomen. Stattdessen häufen sie sich im perinukleären Raum an (Kyme, Haas et al. 2005; Harms and Dehio 2012) und können mehr als 48 Stunden der Abtötung durch die Wirtszelle entkommen. Die *Bartonella*-enthaltenden Vakuolen scheinen ein optimales Kompartiment für die bakterielle Vermehrung darzustellen, welches vor Angriffen durch die angeborene Immunität – zumindest vorübergehend – geschützt ist (Minnick and Battisti 2009).

Transmissionselektronenmikroskopisch (TEM) konnte gezeigt werden, dass sowohl *B. henselae* als auch *B. quintana*, intrazellulär in Makrophagen (THP-1-Zellen) in *Bartonella*-enthaltenden Vakuolen verbleibt (Schulte, Linke et al. 2006). Dies wurde auch für Endothelzellen und murine Makrophagen beschrieben (Brouqui and Raoult 1996; Musso, Badolato et al. 2001; Kempf, Schairer et al. 2005; Kyme, Haas et al. 2005). Bemerkenswerterweise scheint die Morphologie der Wirtszellen nach der bakteriellen Infektion unberührt zu bleiben.

Durch Isolation von *B. henselae*-Mutanten konnten teilweise Proteine identifiziert werden, die die Verschmelzung mit dem Lysosom verhindern. Die Mutanten wiesen beispielsweise Defekte in den Genen für *virulence-associated protein* VapA5, *haemin-binding protein* HbpD, *D-serine/S-alanine/glycine transport protein* CycA auf (Kyme, Haas et al. 2005; Eicher and Dehio 2012).

Wie YadA von *Yersinia enterocolitica* besitzt zudem auch BadA von *B. henselae* antiphagozytische Kapazität, da die Expression von BadA *B. henselae* in menschlichen Makrophagen (J774-Zellen) vor Phagozytose schützt (Riess, Andersson et al. 2004). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch bisher unklar (Harms and Dehio 2012).

Auch im Rahmen der Versuche dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass *B. quintana* München 48 h nach Infektion einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Erreger – vergleichbar dem von *B. henselae* Marseille – aufweist, was darauf hindeutet, dass *B. quintana* München nicht nur Pathogenitätsmechanismen besitzt, um in Wirtszellen zu persistieren, sondern sich sogar intrazellulär zu vermehren. Warum *B. quintana* Toulouse hingegen nur geringe Invasionsraten aufwies und welche Mechanismen dem intrazellulären Überleben von *B. quintana* München in Wirtszellen zugrunde liegen, bleibt jedoch unklar.

4.3. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sind die Resultate einer systematischen Analyse zur Bakterien-Wirtszell-Interaktion von *Bartonella quintana* mit humanen Makrophagen (THP-1-Zellen). Sie liefern einen Beitrag zum besseren Verständnis der Adhärenz, Invasion, intrazellulären Persistenz sowie Zytokin-Sekretion von Wirtszellen nach Infektion mit *B. quintana*.

Da in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass *B. quintana* ein genetischer Abkömmling von *B. henselae* ist (Alsmark, Frank et al. 2004), ergibt sich die Vermutung, dass beide Pathogene ähnliche Pathogenitätsstrategien teilen. Um diese Vermutung näher zu beleuchten, wurden die Ergebnisse im Vergleich zu *Bartonella henselae* bewertet.

Es konnte gezeigt werden, dass *B. quintana* nicht nur eine signifikant geringere Adhärenz an Wirtszellen als *B. henselae* Marseille aufweist, sondern auch eine verminderte intrazelluläre Persistenz und Zytokin-Sekretion. Nur *B. quintana* München zeigt 48 h nach Infektion einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Erreger – vergleichbar dem von *B. henselae* Marseille -, was die Vermutung nahe legt, dass *B. quintana* München nicht nur Pathogenitätsmechanismen besitzt, um in Wirtszellen persistieren, sondern sich sogar intrazellulär vermehren zu können. Da an der Induktion der Zytokin-Sekretion vermutlich Oberflächenproteine von *B. quintana* (Vomps) entscheidend beteiligt sind, die die in dieser Arbeit verwendeten Stämme nicht aufwiesen, sind weitere systematische Analysen notwendig, um die Bedeutung von Vomps und weiteren an der Zytokin-Induktion beteiligten Pathogenitätsfaktoren von *B. quintana* näher zu beleuchten.

Bei kontinuierlich steigender Anzahl einer immunsupprimierten Risikopopulation und dadurch steigender Inzidenz von durch *Bartonella* spp.-induzierten Erkrankungen, ist es von besonderer Bedeutung, die Pathogenitätsmechanismen von *Bartonella quintana* genauer zu untersuchen und zu verstehen, um wirksame Therapiestrategien sowohl gegen die durch *B. quintana* ausgelösten infektiösen als auch vaskuloproliferativen Erkrankungen entwickeln zu können.

Informationen über die Wirt-Pathogen-Interaktion von *B. quintana* sind von besonderer Bedeutung, um Rückschlüsse auf grundlegende Funktionen des menschlichen Immunsystems einerseits und auf mikrobielle Ausweichstrategien andererseits zu gewinnen.

Aber insbesondere auch die Entstehung der vaskuloproliferativen Erkrankungen bazilläre Angiomatose und Peliosis hepatis, sind von besonderer Bedeutung, um die Grundlagen sowohl benigner als auch maligner Neoplasien zu verstehen und neue Therapieansätze zu entwickeln.

Zukünftig könnten verbesserte genetische Manipulationstechniken und die Möglichkeit der Genomsequenzanalyse dazu beitragen, die Rolle von Oberflächenproteinen und anderen Pathogenitätsfaktoren von *B. quintana*, die der Wirtszellinteraktion dieses Pathogens unterliegen, besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Von *Bartonella quintana* und *Bartonella henselae* ist bekannt, dass sie die Fähigkeit besitzen, in verschiedene Wirtszellen zu invadieren und in ihnen zu persistieren, um sowohl infektiöse als auch vaskuloproliferative Erkrankungen auszulösen, von denen insbesondere immunsupprimierte Patienten betroffen sind.

Die Pathogenitätsmechanismen, die diesen Erkrankungen zugrunde liegen, wurden für *B. henselae* in der Vergangenheit näher charakterisiert. Über die Pathogenitätsmechanismen von *B. quintana* ist hingegen nur wenig bekannt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beleuchten die Bakterien-Wirtszell-Interaktion nach Infektion von humanen Makrophagen (THP-1-Zellen) mit *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München im Vergleich zu *B. henselae* Marseille genauer und liefern damit einen Einblick in die Wechselbeziehung von *B. quintana* mit THP-1-Zellen.

Die vorliegende Dissertation lieferte folgende Ergebnisse:

1. *Bartonella quintana* zeigt im Vergleich zu *Bartonella henselae* eine signifikant geringere Adhärenz an THP-1-Makrophagen.
2. Zusammenfassend zeigt sich nach Infektion mit *Bartonella quintana* zu den Zeitpunkten 1, 4 und 24 h nach Infektion im Vergleich zu *Bartonella henselae* eine deutlich verminderte Invasion und intrazelluläre Persistenz des Erregers in Wirtszellen (THP-1-Makrophagen).
3. *Bartonella quintana* Toulouse zeigt zu allen Zeitpunkten nach Infektion nur geringe Invasionsraten.
4. *Bartonella quintana* München weist zu den Zeitpunkten 1, 4 und 24 h nach Infektion geringere Invasionsraten auf als *Bartonella henselae*, zeigt jedoch einen verzögerten Anstieg an intrazellulären Erregern bis 48 h nach Infektion – vergleichbar dem von *B. henselae*.

5. Verglichen mit *Bartonella henselae*, führt eine Infektion mit *Bartonella quintana* - am Beispiel von *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München - zu keiner wesentlichen Induktion der VEGF-Sekretion in THP-1-Makrophagen.
6. Verglichen mit *Bartonella henselae*, führt eine Infektion mit *Bartonella quintana* nur zu einer geringen Induktion der IL-8-Sekretion in Makrophagen (THP-1-Zellen).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede in der Interaktion zwischen den verwendeten *B. quintana*-Stämmen Toulouse und München mit THP-1-Makrophagen im Vergleich zu *B. henselae* Marseille auf.

In Zusammenschau der Ergebnisse wiesen *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München nach Infektion von humanen Makrophagen signifikant niedrigere Raten der Adhärenz, Invasion und Induktion der Zytokin-Sekretion auf. Dennoch zeigt sich – am Beispiel von *B. quintana* München – dass auch *B. quintana* in der Lage ist, nicht nur intrazellulär in Makrophagen über mindestens 48 h zu persistieren, sondern vermutlich auch in ihnen zu proliferieren.

Da die in dieser Dissertation verwendeten Stämme von *B. quintana* – *B. quintana* Toulouse und *B. quintana* München – vor Durchführung der Versuche nicht auf eine Vomp-Expression untersucht wurden, die Vomp-Expression mutmaßlich aber einen bedeutenden Pathogenitätsfaktor von *B. quintana* darstellt, sollten weitere Versuche nach vorheriger Untersuchung auf eine Vomp-Expression durchgeführt werden.

Zukünftig sind auch weitere Versuche notwendig, um zu verstehen, welche Pathogenitätsfaktoren von *B. quintana* eine bedeutende Rolle in der Induktion vaskuloproliferativen Erkrankungen sowie der Fähigkeit zur intrazellulären Persistenz zugrunde liegen.

Durch ein verbessertes Verständnis dieser Mechanismen ergibt sich die Möglichkeit neue Therapiestrategien zur Behandlung von durch *B. quintana* ausgelösten Erkrankungen zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

- Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.
- Alsmark, C. M., A. C. Frank, et al. (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**(26): 9716-9721.
- Anderson, B., K. Sims, et al. (1994). "Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR." J Clin Microbiol **32**(4): 942-948.
- Anderson, B. E. and M. A. Neuman (1997). "*Bartonella* spp. as emerging human pathogens." Clin Microbiol Rev **10**(2): 203-219.
- Badiaga, S. and P. Brouqui (2012). "Human louse-transmitted infectious diseases." Clin Microbiol Infect **18**(4): 332-7.
- Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis (1992). "Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine." FEBS Lett **307**(1): 97-101.
- Bar-Eli, M. (1999). "Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma." Pathobiology **67**(1): 12-18.
- Barbour, A. G. and B. I. Restrepo (2000). "Antigenic variation in vector-borne pathogens." Emerg Infect Dis **6**(5): 449-457.
- Battal, B., M. Kocaoglu, et al. (2010). "Multifocal peliosis hepatis: MR and diffusion-weighted MR-imaging findings of an atypical case." Ups J Med Sci **115**(2): 153-156.
- Batterman, H. J., J. A. Peek, et al. (1995). "*Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells." Infect Immun **63**(11): 4553-4556.
- Benson, L. A., S. Kar, et al. (1986). "Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes." Infect Immun **54**(2): 347-53.
- Bolin, I., L. Norlander, et al. (1982). "Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid." Infect Immun **37**(2): 506-512.
- Borst, P. (1991). "Molecular genetics of antigenic variation." Immunol Today **12**(3): A29-33.

- Brat, D. J., A. C. Bellail, et al. (2005). "The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis." Neuro Oncol **7**(2): 122-133.
- Breitschwerdt, E. B., R. G. Maggi, et al. (2010). "Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii and Bartonella henselae bacteremia in a father and daughter with neurological disease." Parasit Vectors **3**(1): 29.
- Brenner, S. A., J. A. Rooney, et al. (1997). "Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: effects of methods of blood collection and handling." J Clin Microbiol **35**(3): 544-547.
- Brouqui, P. and D. Raoult (1996). "*Bartonella quintana* invades and multiplies within endothelial cells in vitro and in vivo and forms intracellular blebs." Res Microbiol **147**(9): 719-731.
- Burgess, A. W. and B. E. Anderson (1998). "Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells." Microb Pathog **25**(3): 157-164.
- Byam, W., Carroll, J. H., Churchill, J. H., Dimond, L., Sorapure, V. E., Wilson, R. M. (1919). Oxford University Press. Oxford (UK).
- Caniza, M. A., D. L. Granger, et al. (1995). "*Bartonella henselae*: etiology of pulmonary nodules in a patient with depressed cell-mediated immunity." Clin Infect Dis **20**(6): 1505-1511.
- Cannon, J. G., R. G. Tompkins, et al. (1990). "Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever." J Infect Dis **161**(1): 79-84.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-395.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med **9**(6): 653-660.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-257.
- Cerimele, F., L. F. Brown, et al. (2003). "Infectious angiogenesis: Bartonella bacilliformis infection results in endothelial production of angiopoietin-2 and epidermal production of vascular endothelial growth factor." Am J Pathol **163**(4): 1321-7.
- Chang, Y., E. Cesarman, et al. (1994). "Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma." Science **266**(5192): 1865-1869.

- China, B., B. T. N'Guyen, et al. (1994). "Role of YadA in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes." Infect Immun **62**(4): 1275-1281.
- Chomel, B. B., H. J. Boulouis, et al. (2009). "Ecological fitness and strategies of adaptation of Bartonella species to their hosts and vectors." Vet Res **40**(2): 29.
- Cockerell, C. J. and P. E. LeBoit (1990). "Bacillary angiomatosis: a newly characterized, pseudoneoplastic, infectious, cutaneous vascular disorder." J Am Acad Dermatol **22**(3): 501-12.
- Conley, T., L. Slater, et al. (1994). "*Rochalimaea* species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro." J Lab Clin Med **124**(4): 521-528.
- de Chastellier, C. and L. Thilo (1997). "Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle." Eur J Cell Biol **74**(1): 49-62.
- Degli-Esposti, M. A., T. Davis-Smith, et al. (1997). "Activation of the lymphotoxin beta receptor by cross-linking induces chemokine production and growth arrest in A375 melanoma cells." J Immunol **158**(4): 1756-1762.
- Dehio, C., M. Meyer, et al. (1997). "Interaction of Bartonella henselae with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome." J Cell Sci **110 (Pt 18)**: 2141-54.
- Deroanne, C. F., A. Hajitou, et al. (1997). "Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression." Cancer Res **57**(24): 5590-5597.
- Desbaillets, I., A. C. Diserens, et al. (1997). "Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis." J Exp Med **186**(8): 1201-1212.
- Dimopoulos, S., E. Eleftherakis, et al. (2012). "Bartonella quintana endocarditis as a cause of severe aortic insufficiency and heart failure." Hellenic J Cardiol **53**(6): 476-9.
- Drancourt, M., R. Birtles, et al. (1996). "New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease." Lancet **347**(8999): 441-443.

- Drancourt, M. and D. Raoult (1993). "Proposed tests for the routine identification of *Rochalimaea* species." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **12**(9): 710-713.
- Edelson, P. J. (1982). "Intracellular parasites and phagocytic cells: cell biology and pathophysiology." Rev Infect Dis **4**(1): 124-35.
- Eicher, S. C. and C. Dehio (2012). "Bartonella entry mechanisms into mammalian host cells." Cell Microbiol **14**(8): 1166-73.
- Endres, S., J. W. van der Meer, et al. (1987). "Interleukin-1 in the pathogenesis of fever." Eur J Clin Invest **17**(6): 469-474.
- Ferrara, N. (2000). "Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis." Recent Prog Horm Res **55**: 15-35; discussion 35-6.
- Ferrara, N. and W. J. Henzel (1989). "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **161**(2): 851-858.
- Finkenzeller, G., A. Sparacio, et al. (1997). "Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression." Oncogene **15**(6): 669-676.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-1186.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1**(1): 27-31.
- Folkman, J. and M. Klagsbrun (1987). "Angiogenic factors." Science **235**(4787): 442-447.
- Folkman, J., E. Merler, et al. (1971). "Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis." J Exp Med **133**(2): 275-288.
- Foucault, C., K. Barrau, et al. (2002). "*Bartonella quintana* Bacteremia among Homeless People." Clin Infect Dis **35**(6): 684-689.
- Foucault, C., P. Brouqui, et al. (2006). "*Bartonella quintana* characteristics and clinical management." Emerg Infect Dis **12**(2): 217-223.
- Fournier, P. E., H. Lelievre, et al. (2001). "Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients." Medicine (Baltimore) **80**(4): 245-251.

- Franz, B. and V. A. Kempf (2011). "Adhesion and host cell modulation: critical pathogenicity determinants of *Bartonella henselae*." Parasit Vectors **4**: 54.
- Frater-Schroder, M., W. Risau, et al. (1987). "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5277-5281.
- Fuhrmann, O., M. Arvand, et al. (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**(8): 5088-5097.
- Garcia, F. U., J. Wojta, et al. (1990). "*Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells in vitro and is angiogenic in vivo." Am J Pathol **136**(5): 1125-1135.
- Gilmore, R. D., Jr., T. M. Bellville, et al. (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**(5): 3128-3136.
- Goebeler, M., T. Yoshimura, et al. (1997). "The chemokine repertoire of human dermal microvascular endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines." J Invest Dermatol **108**(4): 445-451.
- Greub, G. and D. Raoult (2002). "*Bartonella*: new explanations for old diseases." J Med Microbiol **51**(11): 915-923.
- Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Schulz, T. F., Suerbaum, S. (2005). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer.
- Haraguchi, M., K. Miyadera, et al. (1994). "Angiogenic activity of enzymes." Nature **368**(6468): 198.
- Harms, A. and C. Dehio (2012). "Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp." Clin Microbiol Rev **25**(1): 42-78.
- Hart, P. D., J. A. Armstrong, et al. (1972). "Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria." Infect Immun **5**(5): 803-807.
- Hill, E. M., A. Raji, et al. (1992). "Adhesion to and invasion of cultured human cells by *Bartonella bacilliformis*." Infect Immun **60**(10): 4051-8.

- Hippenstiel, S., S. Soeth, et al. (2000). "Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells." Blood **95**(10): 3044-3051.
- Hoiczky, E., A. Roggenkamp, et al. (2000). "Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins." Embo J **19**(22): 5989-5999.
- Holmes, N. E., S. Opat, et al. (2011). "Refractory *Bartonella quintana* bacillary angiomatosis following chemotherapy for chronic lymphocytic leukaemia." J Med Microbiol **60**(Pt 1): 142-6.
- Huang, S., A. DeGuzman, et al. (2000). "Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice." Clin Cancer Res **6**(6): 2573-2581.
- Iwaki-Egawa, S. and G. M. Ihler (1997). "Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cell membranes and to bind to red cell ghost proteins." FEMS Microbiol Lett **157**(1): 207-17.
- Izzedine, H., O. Rixe, et al. (2007). "Angiogenesis inhibitor therapies: focus on kidney toxicity and hypertension." Am J Kidney Dis **50**(2): 203-218.
- Jacomo, V., P. J. Kelly, et al. (2002). "Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate)." Clin Diagn Lab Immunol **9**(1): 8-18.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002). Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Jiang, B. H., F. Agani, et al. (1997). "V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression." Cancer Res **57**(23): 5328-5335.
- Kaiser, P. O., D. Linke, et al. (2012). "Analysis of the BadA stalk from *Bartonella henselae* reveals domain-specific and domain-overlapping functions in the host cell infection process." Cell Microbiol **14**(2): 198-209.
- Kaiser, P. O., T. Riess, et al. (2011). "*Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections." Int J Med Microbiol **301**(1): 7-15.
- Kaiser, P. O., T. Riess, et al. (2008). "The head of *Bartonella* adhesin A is crucial for host cell interaction of *Bartonella henselae*." Cell Microbiol **10**(11): 2223-2234.

- Kampik, D., R. Schulte, et al. (2000). "*Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections." Infect Immun **68**(5): 2484-2492.
- Karem, K. L., C. D. Paddock, et al. (2000). "*Bartonella henselae*, *B. quintana*, and *B. bacilliformis*: historical pathogens of emerging significance." Microbes Infect **2**(10): 1193-1205.
- Kawasato, K. H., L. C. de Oliveira, et al. (2013). "Detection of *Bartonella henselae* DNA in clinical samples including peripheral blood of immune competent and immune compromised patients by three nested amplifications." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **55**(1): 1-6.
- Kempf, V. A., N. Hitziger, et al. (2002). "Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy?" Trends Microbiol **10**(6): 269-275.
- Kempf, V. A., M. Lebedziejewski, et al. (2005). "Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections." Circulation **111**(8): 1054-1062.
- Kempf, V. A., A. Schairer, et al. (2005). "*Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells." Cell Microbiol **7**(1): 91-104.
- Kempf, V. A., M. Schaller, et al. (2000). "Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication." Cell Microbiol **2**(5): 431-441.
- Kempf, V. A., B. Volkmann, et al. (2001). "Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations." Cell Microbiol **3**(9): 623-632.
- Kempf, V. A. J., Winkler, T. (2004). "*Bartonella henselae* als Ursache vaskuloproliferativer Krankheitsbilder: Neue Aspekte zur Pathogenität bakterieller Infektionserreger." Hyg. Microbiol. **8**: 34-39.
- Kim, S. J., H. Uehara, et al. (2001). "Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice." Neoplasia **3**(1): 33-42.
- Kirby, J. E. and D. M. Nekorchuk (2002). "*Bartonella*-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4656-4661.

- Koch, A. E., P. J. Polverini, et al. (1992). "Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis." Science **258**(5089): 1798-1801.
- Koehler, J. E., F. D. Quinn, et al. (1992). "Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis." N Engl J Med **327**(23): 1625-1631.
- Koehler, J. E., M. A. Sanchez, et al. (1997). "Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis." N Engl J Med **337**(26): 1876-1883.
- Koehler, J. E., M. A. Sanchez, et al. (2003). "Prevalence of *Bartonella* infection among human immunodeficiency virus-infected patients with fever." Clin Infect Dis **37**(4): 559-566.
- Kordick, D. L. and E. B. Breitschwerdt (1995). "Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*." J Clin Microbiol **33**(6): 1655-6.
- Kostrzewski, J. (1949). "The epidemiology of trench fever." Bull Acad Pol Sci (Med) **7**: 233-263.
- Ku, D. D., J. K. Zaleski, et al. (1993). "Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries." Am J Physiol **265**(2 Pt 2): H586-592.
- Kunsch, C., R. K. Lang, et al. (1994). "Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6." J Immunol **153**(1): 153-164.
- Kyme, P., B. Dillon, et al. (2003). "Phase variation in *Bartonella henselae*." Microbiology **149**(Pt 3): 621-629.
- Kyme, P. A., A. Haas, et al. (2005). "Unusual trafficking pattern of *Bartonella henselae* -containing vacuoles in macrophages and endothelial cells." Cell Microbiol **7**(7): 1019-1034.
- La, V. D., L. Tran-Hung, et al. (2005). "*Bartonella quintana* in domestic cat." Emerg Infect Dis **11**(8): 1287-1289.
- Lamas, C., A. Curi, et al. (2008). "Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil - a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **103**(3): 221-35.
- LeBoit, P. E., T. G. Berger, et al. (1989). "Bacillary angiomatosis. The histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease." Am J Surg Pathol **13**(11): 909-920.

- Lei, Y., H. Haider, et al. (2004). "Therapeutic angiogenesis. Devising new strategies based on past experiences." Basic Res Cardiol **99**(2): 121-132.
- Li, H., Y. Tong, et al. (2012). "Complete genome sequence of *Bartonella quintana*, a bacterium isolated from rhesus macaques." J Bacteriol **194**(22): 6347.
- Liberto, M. C., G. Matera, et al. (2003). "In vitro *Bartonella quintana* infection modulates the programmed cell death and inflammatory reaction of endothelial cells." Diagn Microbiol Infect Dis **45**(2): 107-115.
- Linke, D., T. Riess, et al. (2006). "Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function." Trends Microbiol **14**(6): 264-270.
- Liu, Y., S. R. Cox, et al. (1995). "Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer." Circ Res **77**(3): 638-643.
- Luca, M., S. Huang, et al. (1997). "Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis." Am J Pathol **151**(4): 1105-1113.
- Lucey, D., M. J. Dolan, et al. (1992). "Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations." Clin Infect Dis **14**(3): 683-688.
- MackKichan, J. K., H. L. Gerns, et al. (2008). "A SacB mutagenesis strategy reveals that the *Bartonella quintana* variably expressed outer membrane proteins are required for bloodstream infection of the host." Infect Immun **76**(2): 788-95.
- Madtes, D. K., E. W. Raines, et al. (1988). "Induction of transforming growth factor-alpha in activated human alveolar macrophages." Cell **53**(2): 285-293.
- Maggi, R. G., P. E. Mascarelli, et al. (2011). "*Bartonella* spp. bacteremia in high-risk immunocompetent patients." Diagn Microbiol Infect Dis **71**(4): 430-7.
- Maguina, C., P. J. Garcia, et al. (2001). "Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era." Clin Infect Dis **33**(6): 772-9.
- Maguina, C., H. Guerra, et al. (2009). "Bartonellosis." Clin Dermatol **27**(3): 271-80.
- Maher, E. R. and W. G. Kaelin, Jr. (1997). "von Hippel-Lindau disease." Medicine (Baltimore) **76**(6): 381-391.

- Manders, S. M. (1996). "Bacillary angiomatosis." Clin Dermatol **14**(3): 295-9.
- Mandle, T., H. Einsele, et al. (2005). "Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*." Blood **106**(4): 1215-22.
- Mantovani, B. (1981). "Phagocytosis of immune complexes mediated by IgM and C3 receptors by macrophages from mice treated with glycogen." J Immunol **126**(1): 127-30.
- Marshall, G. D., Jr., S. K. Agarwal, et al. (1998). "Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students." Brain Behav Immun **12**(4): 297-307.
- Masood, R., J. Cai, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(3): 979-984.
- Matsusaka, T., K. Fujikawa, et al. (1993). "Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10193-10197.
- Maurer, T. A., Berger, T. G. (1998). Dermatologic manifestations of HIV.
- Maurin, M. and D. Raoult (1996). "*Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections." Clin Microbiol Rev **9**(3): 273-292.
- McCord, A. M., A. W. Burgess, et al. (2005). "Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells promotes monocyte/macrophage chemoattractant protein 1 gene expression and protein production and triggers monocyte migration." Infect Immun **73**(9): 5735-42.
- McCord, A. M., S. I. Resto-Ruiz, et al. (2006). "Autocrine role for interleukin-8 in *Bartonella henselae*-induced angiogenesis." Infect Immun **74**(9): 5185-90.
- Meghari, S., J. M. Rolain, et al. (2006). "Antiangiogenic effect of erythromycin: an in vitro model of *Bartonella quintana* infection." J Infect Dis **193**(3): 380-386.
- Mehock, J. R., C. E. Greene, et al. (1998). "*Bartonella henselae* invasion of feline erythrocytes in vitro." Infect Immun **66**(7): 3462-6.
- Minnick, M. F. and J. M. Battisti (2009). "Pestilence, persistence and pathogenicity: infection strategies of *Bartonella*." Future Microbiol **4**(6): 743-58.

- Monteil, R. A., J. F. Michiels, et al. (1994). "Histological and ultrastructural study of one case of oral bacillary angiomatosis in HIV disease and review of the literature." Eur J Cancer B Oral Oncol **30B**(1): 65-71.
- Mosepele, M., D. Mazo, et al. (2012). "Bartonella infection in immunocompromised hosts: immunology of vascular infection and vasoproliferation." Clin Dev Immunol **2012**: 612809.
- Moulin, C., J. Kanitakis, et al. (2012). "Cutaneous bacillary angiomatosis in renal transplant recipients: report of three new cases and literature review." Transpl Infect Dis **14**(4): 403-9.
- Muller, N. F., P. O. Kaiser, et al. (2011). "Trimeric autotransporter adhesin-dependent adherence of *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Yersinia enterocolitica* to matrix components and endothelial cells under static and dynamic flow conditions." Infect Immun **79**(7): 2544-53.
- Musso, T., R. Badolato, et al. (2001). "Interaction of *Bartonella henselae* with the murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response." Infect Immun **69**(10): 5974-5980.
- Nicholson, T. L., S. L. Brockmeier, et al. (2009). "Contribution of *Bordetella bronchiseptica* filamentous hemagglutinin and pertactin to respiratory disease in swine." Infect Immun **77**(5): 2136-46.
- Nunoshiba, T., T. DeRojas-Walker, et al. (1995). "Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated murine macrophages." Infect Immun **63**(3): 794-798.
- O'Rourke, F., T. Schmidgen, et al. (2011). "Adhesins of *Bartonella* spp." Adv Exp Med Biol **715**: 51-70.
- Ohl, M. E. and D. H. Spach (2000). "*Bartonella quintana* and urban trench fever." Clin Infect Dis **31**(1): 131-135.
- Padmalayam, I., K. Karem, et al. (2000). "The gene encoding the 17-kDa antigen of *Bartonella henselae* is located within a cluster of genes homologous to the *virB* virulence operon." DNA Cell Biol **19**(6): 377-382.
- Pulliainen, A. T. and C. Dehio (2012). "Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation." FEMS Microbiol Rev **36**(3): 563-99.
- Raoult, D., M. Drancourt, et al. (1994). "*Bartonella (Rochalimaea) quintana* isolation in patient with chronic adenopathy, lymphopenia, and a cat." Lancet **343**(8903): 977.

- Raoult, D., P. E. Fournier, et al. (2003). "Outcome and treatment of *Bartonella* endocarditis." Arch Intern Med **163**(2): 226-230.
- Raoult, D. and V. Roux (1999). "The body louse as a vector of reemerging human diseases." Clin Infect Dis **29**(4): 888-911.
- Regnery, R. L., B. E. Anderson, et al. (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**(2): 265-274.
- Rehman, J., J. Li, et al. (2003). "Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors." Circulation **107**(8): 1164-1169.
- Resto-Ruiz, S. I., M. Schmiederer, et al. (2002). "Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection." Infect Immun **70**(8): 4564-4570.
- Riess, T., S. G. Andersson, et al. (2004). "*Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response." J Exp Med **200**(10): 1267-1278.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.
- Rofstad, E. K. and E. F. Halsor (2002). "Hypoxia-associated spontaneous pulmonary metastasis in human melanoma xenografts: involvement of microvascular hot spots induced in hypoxic foci by interleukin 8." Br J Cancer **86**(2): 301-308.
- Rojas, C. M., J. H. Ham, et al. (2002). "HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13142-7.
- Rolain, J. M., D. Arnoux, et al. (2003). "Experimental infection of human erythrocytes from alcoholic patients with *Bartonella quintana*." Ann N Y Acad Sci **990**: 605-611.
- Rolain, J. M., P. Brouqui, et al. (2004). "Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species." Antimicrob Agents Chemother **48**(6): 1921-1933.
- Rolain, J. M., C. Foucault, et al. (2003). "Erythroblast cells as a target for *Bartonella quintana* in homeless people." Ann N Y Acad Sci **990**: 485-487.

- Rolain, J. M., C. Foucault, et al. (2002). "*Bartonella quintana* in human erythrocytes." Lancet **360**(9328): 226-228.
- Rolain, J. M., M. Franc, et al. (2003). "Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France." Emerg Infect Dis **9**(3): 338-342.
- Rolain, J. M., M. Maurin, et al. (2003). "Culture and antibiotic susceptibility of *Bartonella quintana* in human erythrocytes." Antimicrob Agents Chemother **47**(2): 614-619.
- Roulston, A., R. C. Marcellus, et al. (1999). "Viruses and apoptosis." Annu Rev Microbiol **53**: 577-628.
- Rudikoff, D., R. G. Phelps, et al. (1989). "Acquired immunodeficiency syndrome-related bacillary vascular proliferation (epithelioid angiomas): rapid response to erythromycin therapy." Arch Dermatol **125**(5): 706-707.
- Ryuto, M., M. Ono, et al. (1996). "Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1." J Biol Chem **271**(45): 28220-28228.
- Salvatore, P., A. Casamassimi, et al. (2008). "Detrimental effects of *Bartonella henselae* are counteracted by L-arginine and nitric oxide in human endothelial progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(27): 9427-32.
- Sander, A., S. Kretzer, et al. (2000). "Hemin-dependent growth and hemin binding of *Bartonella henselae*." FEMS Microbiol Lett **189**(1): 55-59.
- Scadden, D. T. (2003). "AIDS-related malignancies." Annu Rev Med **54**: 285-303.
- Schmid, M. C., F. Scheidegger, et al. (2006). "A translocated bacterial protein protects vascular endothelial cells from apoptosis." PLoS Pathog **2**(11): e115.
- Schmid, M. C., R. Schulein, et al. (2004). "The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells." Mol Microbiol **52**(1): 81-92.
- Schmidt, H. U., T. Kaliebe, et al. (1996). "Isolation of *Bartonella quintana* from an HIV-positive patient with bacillary angiomas." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **15**(9): 736-741.

- 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**(3): 141-147.
- Schulein, R. and C. Dehio (2002). "The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection." Mol Microbiol **46**(4): 1053-67.
- Schulein, R., P. Guye, et al. (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**(3): 856-61.
- Schulte, B., D. Linke, et al. (2006). "*Bartonella quintana* variably expressed outer membrane proteins mediate vascular endothelial growth factor secretion but not host cell adherence." Infect Immun **74**(9): 5003-13.
- Schultz, M. G. (1968). "Daniel Carrion's experiment." N Engl J Med **278**(24): 1323-6.
- Scott, M. J., J. J. Hoth, et al. (2003). "Natural killer cell activation primes macrophages to clear bacterial infection." Am Surg **69**(8): 679-86; discussion 686-7.
- Seubert, A., R. Hiestand, et al. (2003). "A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis." Mol Microbiol **49**(5): 1253-66.
- Seubert, A., R. Schulein, et al. (2002). "Bacterial persistence within erythrocytes: a unique pathogenic strategy of *Bartonella* spp." Int J Med Microbiol **291**(6-7): 555-60.
- Shweiki, D., A. Itin, et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." Nature **359**(6398): 843-845.
- Singh, R. K., M. Gutman, et al. (1994). "Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice." Cancer Res **54**(12): 3242-3247.
- Stein, B. and A. S. Baldwin, Jr. (1993). "Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B." Mol Cell Biol **13**(11): 7191-7198.
- Stein, B., P. C. Cogswell, et al. (1993). "Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction." Mol Cell Biol **13**(7): 3964-74.

- Strieter, R. M. (2002). "Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(4): L688-689.
- Szekanecz, Z., T. Besenyei, et al. (2009). "Angiogenesis in rheumatoid arthritis." Autoimmunity **42**(7): 563-73.
- Tappero, J. W., J. E. Koehler, et al. (1993). "Bacillary angiomatosis and bacillary splenitis in immunocompetent adults." Ann Intern Med **118**(5): 363-5.
- Van Meir, E. G., P. J. Polverini, et al. (1994). "Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells." Nat Genet **8**(2): 171-176.
- Vayssier-Taussat, M., D. Le Rhun, et al. (2010). "The Trw type IV secretion system of *Bartonella* mediates host-specific adhesion to erythrocytes." PLoS Pathog **6**(6): e1000946.
- Verma, A., G. E. Davis, et al. (2000). "Infection of human endothelial cells with *Bartonella bacilliformis* is dependent on Rho and results in activation of Rho." Infect Immun **68**(10): 5960-9.
- Verma, A., G. E. Davis, et al. (2001). "Formation of stress fibres in human endothelial cells infected with *Bartonella bacilliformis* is associated with altered morphology, impaired migration and defects in cell morphogenesis." Cell Microbiol **3**(3): 169-180.
- Vermi, W., F. Facchetti, et al. (2006). "Role of dendritic cell-derived CXCL13 in the pathogenesis of *Bartonella henselae* B-rich granuloma." Blood **107**(2): 454-62.
- Vilibic-Cavlek, T., D. Karlovic-Martinkovic, et al. (2012). "High prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* antibodies in Croatian patients presenting with lymphadenopathy." Pol J Microbiol **61**(4): 315-7.
- Visser, L. G., P. S. Hiemstra, et al. (1996). "Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes." Infect Immun **64**(5): 1653-1658.
- Volkman, B. (2004). Induktion von vaskulo-endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF) durch *Bartonella henselae*: 64-65.
- Weinrauch, Y. and A. Zychlinsky (1999). "The induction of apoptosis by bacterial pathogens." Annu Rev Microbiol **53**: 155-87.

- Welch, D. F., D. A. Pickett, et al. (1992). "Rochalimaea henselae sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis." J Clin Microbiol **30**(2): 275-80.
- Xu, Y. H., Z. Y. Lu, et al. (1995). "Purification of deformin, an extracellular protein synthesized by Bartonella bacilliformis which causes deformation of erythrocyte membranes." Biochim Biophys Acta **1234**(2): 173-83.
- Yancopoulos, G. D., S. Davis, et al. (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." Nature **407**(6801): 242-248.
- Yla-Herttuala, S., T. T. Rissanen, et al. (2007). "Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine." J Am Coll Cardiol **49**(10): 1015-1026.
- Yoshida, S., M. Ono, et al. (1997). "Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis." Mol Cell Biol **17**(7): 4015-4023.
- Zangwill, K. M., D. H. Hamilton, et al. (1993). "Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test." N Engl J Med **329**(1): 8-13.
- Zhang, P., B. B. Chomel, et al. (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**(37): 13630-13635.
- Zigangirova, N. A. and A. L. Gintsburg (2004). "[Role of apoptosis in the regulation of the infectious process]." Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol(6): 106-13.
- Zimmermann, R., V. A. Kempf, et al. (2003). "Hemin binding, functional expression, and complementation analysis of Pap 31 from Bartonella henselae." J Bacteriol **185**(5): 1739-1744.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immuno deficiency syndrome</i>
AP-1	<i>activating protein-1</i>
B.	Bartonella
BA	bazilläre Angiomatose
BadA	<i>Bartonella</i> Adhäsion A
BCV	<i>Bartonella</i> -enthaltende Vakuole, <i>Bartonella-containing vacuole</i>
<i>Bartonella</i> spp.	<i>Bartonella</i> Spezies
Bep	<i>Bartonella effector protein</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
<i>B.h.</i>	<i>Bartonella henselae</i>
<i>B.q.</i>	<i>Bartonella quintana</i>
BrpA	<i>Bartonella repeat protein A</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CBA	Columbia-Blutagarplatte
C/EBP- β	CCAAT-Verstärker bindendes Protein- β
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CO ₂	Kohlendioxid
cm ²	Quadratcentimeter
CSD	<i>cat scratch disease</i>
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix, <i>extracellular matrix</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPC	endotheliale Progenitorzelle

<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FHA	<i>filamentous hemagglutinin adhesin</i>
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
gp 120	Glykoprotein 120
h	Stunde
Hbp	<i>hemin-binding protein</i>
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HHV-8	Humanes Herpesvirus-8
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor-1</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i>
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
KKK	Katzenkratzkrankheit
µl	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MCP	<i>monocyte chemoattractat protein</i>
min	Minute
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter

mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
nm	Nanometer
NO	Stickstoff
OD	optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i>
Pap	Phagen-assoziiertes Protein
pg	Pikogramm
PH	Peliosis hepatis
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PNPP	P-Nitrophenyl-Phosphat
rpm	<i>rounds per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
spp.	Spezies (lat.: Arten)
subsp.	Subspezies (lat.: Unterarten)
TAA	<i>trimeric autotransporter adhesin</i>
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TVSS	<i>type V secretion system</i>
UVB	Ultraviolett-B
Vap	<i>virulence-associated protein</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	VEGF-Rezeptor
Vomp	<i>variably expressed outer membrane protein</i>
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsion A
z.B.	zum Beispiel

8. Publikationen

Publikation, die aus dieser Arbeit hervorging:

Schulte, B., Linke, D., Klumpp, S., Schaller, M., Riess, T., Autenrieth, I. B., Kempf, V. A. 2006 *Bartonella quintana* variably expressed outer membrane proteins mediate vascular endothelial growth factor secretion but not host cell adherence. Infect Immun. 74(9):5003-5013.

9. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Ingo B. Autenrieth möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen bedanken.

Mein Dank gilt Frau Dr. med. Berit Schulte für ihre Betreuung, die zahlreichen Ideen und Denkanstöße sowie die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Herrn Prof. Dr. med. Volkhard Kempf danke ich für die Bereitschaft bei Fragestellungen mit Ratschlägen hilfreich zur Seite zu stehen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe und der Forschungsabteilung für die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung bedanken. Insbesondere Andrea Schäfer und Diana Neumann gebührt Dank für die Unterstützung und Mithilfe an Experimenten.