

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I.B. Autenrieth**

**Die Pathogenität von *Bartonella henselae* im Kontext
von Angiogenese und Apoptose**

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

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

**vorgelegt von
Jeannette Fiebig**

**aus
Erfurt**

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. V. Kempf

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Kandolf

Stilles Reifen

*Alles fügt sich und erfüllt sich,
mußt es nur erwarten können
und dem Werden deines Glückes
Jahr und Felder reichlich gönnen.*

*Bis du eines Tages jenen
reifen Duft der Körner spürest
und dich aufmachst und die Ernte
in die tiefen Speicher führest.*

Christian Morgenstern

**Meinem Freund Alexander
und
meiner Familie gewidmet**

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Die Gattung <i>Bartonella</i>	1
1.1.1	Taxonomie und Geschichte	1
1.1.2	Bakteriologie	2
1.1.3	Pathogenitätsfaktoren und -strategien von <i>B. henselae</i>	3
1.1.4	Die klinischen Manifestationen einer <i>B. henselae</i> -Infektion	7
1.1.4.1	Katzenkratzkrankheit (KKK, <i>cat scratch disease</i>)	7
1.1.4.2	Bazilläre Angiomatose (BA) und Peliosis hepatis (PH)	8
1.1.5	Epidemiologie, Diagnostik und Therapie der <i>B. henselae</i> -Infektion	9
1.2	Angiogenese	10
1.2.1	Der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1)	11
1.2.2	Zytokine	12
1.2.2.1	Der <i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)	12
1.2.2.2	Die VEGF-Rezeptoren: Ihre Struktur und ihre Funktionen	16
1.2.2.3	Interleukin-8 (IL-8)	17
1.3	Apoptose	18
1.3.1	Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	19
1.4	Zielsetzung der Arbeit	20
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	21
2.1	Materialien	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Weitere Materialien	21
2.1.3	Chemikalien	22
2.1.4	Oligonukleotide	22
2.1.5	Antibiotika und Enzyme	23
2.1.6	Bakterienstämme	23
2.1.7	Medien	24
2.1.8	Kits	25
2.1.9	IL-8- und VEGF-ELISA	25
2.1.10	Zusätzlich verwendete Materialien und Chemikalien	26
2.2	Methoden - Bakterien	26
2.2.1	Anzucht von Bakterienkulturen für <i>in vitro</i> Infektionen	26
2.2.2	Herstellung hitzegetöteter Bakterien	27

2.3	Methoden - Zellkultur	27
2.3.1	Kultivierung von HeLa 229-Zellen	27
2.3.2	Kultivierung von EA.hy 926-Zellen	28
2.3.3	Kultivierung von Mono Mac 6-Zellen	28
2.3.4	Kultivierung von HUVE-Zellen	28
2.3.5	Infektion von Zellen mit Bakterien	29
2.4	Methoden - ELISA	30
2.4.1	Gewinnung von Zellkulturüberständen	30
2.4.2	Bestimmung der VEGF-Produktion mittels ELISA	30
2.4.3	Bestimmung der IL-8-Produktion mittels ELISA	31
2.5	Methoden - Apoptoseinhibition in MM6 durch <i>B. henselae</i>	31
2.5.1	Bestimmung der Zellviabilität - MTS-Assay	32
2.5.2	DNA-Laddering	32
2.6	Methoden - Zytotoxizitätstest	34
2.7	Methoden - RNA	35
2.7.1	RNA-Extraktion aus Wirtszellen	36
2.7.2	Reverse Transkription	37
2.7.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	38
2.7.4	DNA-Gelelektrophorese	39
2.7.5	<i>Real-time</i> -(RT-) PCR am <i>LightCycler</i>	39
2.8	Methoden - Gen-Microarrays	41
2.8.1	<i>Microarray</i> -Arten	42
2.8.2	Grundlagen der Gen- <i>Microarray</i> -Technologie und Durchführung	42
2.8.3	Vorbereitung der Proben und Auswertung des <i>Microarrays</i>	44
2.9	Statistik	44
<u>3</u>	<u>Ergebnisse</u>	45
3.1	Induktion angiogenetischer Gene nach Infektion mit <i>B. henselae</i> in verschiedenen Zelllinien	45
3.1.1	Induktion von VEGF-mRNA und IL-8-mRNA in HeLa 229-Zellen	45
3.1.2	Induktion von VEGF-mRNA und IL-8-mRNA in HUVE-Zellen	47
3.1.3	Induktion von VEGF-mRNA in Mono Mac 6- und EA.hy 926-Zellen	49
3.2	Zytokininduktion durch <i>B. henselae</i> in HeLa 229-Zellen	51
3.2.1	Induktion der VEGF-Sekretion in HeLa 229-Zellen	51
3.2.2	Induktion der IL-8-Sekretion in HeLa 229-Zellen	52
3.2.3	Einfluss von hitzegetöteten und Gentamicin-behandelten <i>B. henselae</i> auf die Zytokinsekretion von HeLa 229-Zellen	52

3.3	Geninduktion in verschiedenen Zelllinien durch <i>B. henselae</i>	54
3.3.1	Auslösung eines angiogenetischen Programms in HeLa 229-Zellen durch <i>B. henselae</i>	54
3.3.2	Auslösung eines angiogenetischen Programms in HUVE-Zellen durch <i>B. henselae</i>	57
3.4	Zellviabilität und VEGF-Sekretion nach einer Infektion mit <i>B. henselae</i> und anderen Bakterien	59
3.4.1	Kinetik der Zellviabilitätsänderung mittels Zytotoxizitätstest	59
3.4.2	Kinetik der Zellviabilitätsänderung mittels MTS-Assay	59
3.4.3	Kinetik der VEGF-Sekretion nach Infektion mit <i>B. henselae</i>	61
3.5	Abhängigkeit der Viabilitätsänderung und der VEGF-Sekretion von der ablaufenden Infektion mit <i>B. henselae</i> und anderen Bakterien in HeLa 229-Zellen	61
3.5.1	Nachweis der Zellviabilität mittels Zytotoxizitätstest	61
3.5.2	Nachweis der Zellviabilität mittels MTS-Assay	62
3.5.3	VEGF-Sekretion nach Infektion mit <i>B. henselae</i>	64
3.6	Einfluss von hitzegetöteten Bakterien auf Viabilität und Zytokinproduktion von HeLa 229-Zellen	65
3.6.1	Zellviabilität nach Infektion mit hitzegetöteten Bakterien	65
3.6.2	VEGF-Sekretion nach Infektion mit hitzegetöteten Bakterien	67
3.7	Apoptoseinhibition durch <i>B. henselae</i> in Mono Mac 6-Zellen	69
3.7.1	Nachweis der Apoptoseinhibition mittels DNA-Laddering	69
3.7.2	Nachweis der Apoptoseinhibition mittels MTS-Assay	70
3.8	Induktion der VEGF-Sekretion durch <i>B. henselae</i> in Mono Mac 6-Zellen	71
3.9	Apoptoseinhibition durch <i>B. henselae</i> in HeLa 229-Zellen	73
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	74
4.1	Pathogenität von <i>B. henselae</i> im Kontext der Angiogenese	75
4.1.1	VEGF als Mediator vaskuloproliferativer Erkrankungen	76
4.1.2	Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort nach Infektion mit <i>B. henselae</i> in HeLa 229- und HUVE-Zellen	81
4.1.3	Die Rolle von HIF-1 im Rahmen einer Infektion mit <i>B. henselae</i>	85
4.2	Pathogenität von <i>B. henselae</i> im Kontext der Apoptose	85
4.2.1	Der Transkriptionsfaktor NF- κ B und seine Rolle in der Apoptose	87
4.2.2	Apoptoseinhibition in verschiedenen Zelllinien durch <i>B. henselae</i>	88
4.2.3	Die Bedeutung der Zelladhärenz von <i>B. henselae</i> als Wegbereiter antiapoptotischer Prozesse	90

4.3	Vergleichende Betrachtungen gramnegativer intrazellulärer Bakterien - <i>B. henselae</i> ein Bakterium mit besonderen Fähigkeiten	91
4.4	Modulationsdynamik von Angiogenese und Apoptose im Rahmen einer <i>B. henselae</i> -Infektion	96
4.5	Ausblick	98
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	99
<u>6</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	101
<u>7</u>	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	126
<u>8</u>	<u>Anhang</u>	132
<u>9</u>	<u>Danksagung</u>	136
<u>10</u>	<u>Publikationen</u>	137
<u>11</u>	<u>Lebenslauf</u>	138

1. Einleitung

1.1 Die Gattung *Bartonella*

1.1.1 Taxonomie und Geschichte

Derzeit umfasst die Gattung *Bartonella* 22 Spezies, wobei *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii subsp. berkhoffi*, *B. vinsonii subsp. arupensis*, *B. clarridgeiae*, *B. grahamii* und *B. washoensis* im human-pathogenen Kontext relevant und für ein breites Spektrum klinischer Manifestationen verantwortlich sind [Birtles und Raoult, 1998; Johnson *et al.*, 2003; Kosoy *et al.*, 2003].

B. bacilliformis, der Erreger der Carrion'schen Krankheit, die in den Anden endemisch ist, wird durch die Sandfliegenarten *Phlebotomus* und *Lutzmyia* auf den Menschen übertragen [Birtles und Raoult, 1998]. Die Erkrankung verläuft in zwei Schüben, wobei die Inkubationszeit zwei bis sechs Wochen beträgt. Zu Beginn befällt *B. bacilliformis* die Erythrozyten, was zu einer hämolytischen Anämie mit akut hohem und intermittierendem Fieber, Hepatosplenomegalie, generalisierter Lymphadenopathie und Tachykardie bis hin zum Schock führen kann. Unbehandelt hat das erste Stadium der Erkrankung eine sehr hohe Letalität (40-85 %) [Ihler, 1996]. Wird diese gefährliche Phase überlebt, kann nach mehreren Wochen die chronische Phase eintreten. Hier können sich teilweise am ganzen Körper pruriginöse Gefäßproliferationen ausbilden, wobei neben der Haut auch Schleimhäute betroffen sein können. Diese noduloverrukösen, teleangiektatischen Granulome, auch *Verruga peruana* genannt, sind histologisch durch vermehrte Endothelzellproliferation gekennzeichnet und heilen nach mehreren Wochen spontan ab. Erstmals wurde der Erreger 1909 von A. Barton bei einer Blutuntersuchung entdeckt. In einem Selbstversuch wies dann der peruanische Medizinstudent D. Carrion nach, dass die akute Fieberphase und die chronische Form (*Veruga peruana*) zwei Bilder ein und derselben Erkrankung darstellen. Schließlich erhielt die Fieberphase den Namen „Oroya-Fieber“, nachdem nahe La Oroya in Peru mehrere tausend Arbeiter dieser zum Opfer fielen [Conley *et al.*, 1994; Autenrieth und Haimerl, 1998; Rolain *et al.*, 2004].

B. quintana ist der Erreger des „Fünf-Tage-Fiebers“, das während des Ersten Weltkrieges endemisch auftrat („Schützengrabenfieber“). Nach einer ca. 3-wöchigen Inkubationszeit setzen Kopfschmerzen, Fieberschübe und allgemeine Krankheitssymptome ein. Zudem kann eine Endokarditis auftreten. Heutzutage verursacht *B. quintana* vor allem Bakteriämien oder tritt als Erreger der Bazillären Angiomatose in Erscheinung. Die Übertragung erfolgt durch Kleiderläuse von Mensch zu Mensch, wobei vor allem Obdachlose und Alkoholiker betroffen sind [Koehler *et al.*, 1992; Drancourt *et al.*, 1995; Zeaiter *et al.*, 2002].

In den 80-iger Jahren wurde erstmals über eine atypische subkutane HIV-assoziierte Infektion berichtet [Stoler *et al.*, 1983]. Als für das dabei auftretende Fieber und für die Bakteriämie ursächliches Bakterium konnte später *B. henselae* identifiziert werden. Später gelang es, die Erreger-DNA aus der Wundflüssigkeit von an Bazillärer Angiomatose erkrankten Patienten zu isolieren [Relman *et al.*, 1990; Slater *et al.*, 1990; Regnery *et al.*, 1992a]. 1992 wurde schließlich ein Zusammenhang zwischen *B. henselae* und der „Katzenkratzkrankheit“ (KKK, *cat scratch disease*) gefunden [Regnery *et al.*, 1992b]. Noch im gleichen Jahr wurde *B. henselae* als ursächliches Bakterium charakterisiert und nach D. Hensel benannt, die an den Forschungsarbeiten beteiligt war. Die verbleibenden 13 Spezies der Gattung *Bartonella* spielen nach heutigem Wissen überwiegend in der Veterinärmedizin eine Rolle.

1.1.2 Bakteriologie

Bartonella spp. sind ca. 2 µm lange und 0,5 µm breite, leicht gekrümmte, gram- und oxidasenegative Stäbchenbakterien. Die Größe des Genoms liegt bei etwa 2 Mb [Roux *et al.*, 1995]. *Bartonella* spp. gehören, wie *Brucella* spp. und *Agrobacterium* spp., zu den α2-Proteobakterien [O'Connor *et al.*, 1991].

Die günstigsten *in vitro* Kulturbedingungen von Bartonellen stellen ein mit Blut oder Hämin angereicherter Agar oder Zellkulturen dar. Die Erreger vermehren sich fakultativ intrazellulär und wachsen bei 35-37 °C, erhöhter Luftfeuchtigkeit und 5 %-igem CO₂-Gehalt auf unbelebten Nährboden insgesamt aber nur sehr langsam. Daher kann man erst nach 2-7 Wochen die Bakterienkolonien erkennen [Regnery *et al.*, 1992a; Drancourt und Raoult, 1993].

1.1.3 Pathogenitätsfaktoren und -strategien von *B. henselae*

B. henselae löst insbesondere bei Personen mit geschwächter zellulärer Immunität schwere Krankheitsbilder aus [Koehler *et al.*, 1988; Kemper *et al.*, 1990; Caniza *et al.*, 1995]. Aufgrund dessen, dass gerade immunsupprimierte Menschen betroffen sind, geht man davon aus, dass das Bakterium intrazellulär persistieren kann. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass Infektionen häufig rezidivierend verlaufen und gerade Antibiotika mit hoher intrazellulärer Wirksamkeit gute Resultate erzielen. *B. henselae* konnte 1995 entsprechend auch intrazellulär in Erythrozyten und in humanen Epithelzellen nachgewiesen werden [Batterman *et al.*, 1995; Kordick und Breitschwerdt, 1995].

Eine wichtige Strategie von *B. henselae* beruht darauf, an Endothelzellen (EZ) zu adhären und diese zu invadieren. Indem *B. henselae* u.a. die Apoptose in infizierten EZ inhibiert, hemmt es die Immunreaktion. Gleichzeitig regt es die Zelle zur Proliferation an [Kempf und Winkler, 2004]. Die Stimulation von Migration und Proliferation wurde *in vitro* an aus der *V. umbilicalis* isolierten Zellen (HUVEC) gezeigt [Conley *et al.*, 1994; Palmari *et al.*, 1996]. Grundlage dafür scheint die Fähigkeit von *B. henselae* zu sein, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), Angiopoetin 2, VEGF-Rezeptor-1 und -2 und IL-8 zu induzieren, die alle Schlüsselproteine innerhalb der Angiogenese darstellen. Von diesen zählt VEGF, das durch HIF-1 reguliert wird, zu den stärksten Mitogenen von EZ. Zusätzlich kann *B. henselae* aber auch durch Induktion der rac GTPase in der Zielzelle Angiogenese stimulieren und Apoptose inhibieren [Kempf *et al.*, 2001a; Cerimele *et al.*, 2003]. In Makrophagen kann *B. henselae* neben VEGF und IL-8 des Weiteren IL-1 β induzieren, das zu den proinflammatorischen Zytokinen zählt und indirekt die Angiogenese beeinflusst [Resto-Ruiz *et al.*, 2002].

Mit *B. henselae* infizierte EZ weisen eine höhere Viabilität auf als uninfizierte Zellen [Kirby und Nekorchuk, 2002]. Vermutlich bedient sich *B. henselae* der Proteinbiosynthese der Wirtszelle, um sich intrazellulär zu vermehren, wobei es sich außerdem durch die induzierte Zellproliferation seinen eigenen „Lebensraum“ vergrößern kann. Diese Annahme wird dadurch gestärkt, dass die tumorösen Bilder einer *B. henselae*-Infektion nach antibiotischer Therapie wieder zurückgehen [Webster *et al.*, 1992; Kempf *et al.*, 2001a].

B. henselae nutzt diverse Mechanismen, um an EZ bzw. an Wirtszellen zu adhären und um diese zu invadieren. Zu erwähnen sind dabei die neun Außenmembranproteine (*outer membrane proteins*, OMPs) von *B. henselae*, die bei Zugabe zu EZ zu einer Aktivierung von NF- κ B und zur Induktion von ICAM-1 und E-Selektin führen. Diese Adhäsionsproteine stimulieren zudem auch die Interaktion und Adhäsion von polymorphkernigen Neutrophilen, die die frühe Phase der Immunantwort einer bakteriellen Infektion regulieren [Welch *et al.*, 1993; Burgess und Anderson, 1998; Fuhrmann *et al.*, 2001]. Zudem spricht vieles dafür, dass unter den Proteinen der Außenmembran ein proangiogenetischer Faktor existiert, der die Proliferation von HUVE-Zellen ohne direkten Kontakt stimulieren kann [Rhombert *et al.*, 2004].

B. henselae exprimieren Typ IV-ähnliche-Pili, die für die Adhärenz, Autoagglutination, Penetranz und somit für die Virulenz des Bakteriums sehr wichtig sind. Eine direkte Korrelation zwischen der Invasion der EZ und der Expression von „Pili“ konnte 1995 nachgewiesen werden. Auch die Induktion verschiedener proangiogenetischer Zytokine wird vermutlich durch das Vorhandensein dieses „Pili“-Proteins mitbestimmt [Batterman *et al.*, 1995; Anderson und Neuman, 1997; Kempf *et al.*, 2001a]. Inzwischen wurde innerhalb der Arbeitsgruppe die Natur des „Pilus“ aufgeklärt. Es handelt sich um ein 340 kDa großes trimeres Adhäsionsmolekül (TAA, *trimeric autotransporter adhesin*), bestehend aus Kopf, Hals-Region, Stiel und Membrananker, das dem *Y. enterocolitica* Adhäsion A (YadA) in seiner Struktur sowie in seiner Funktion sehr ähnlich ist, und daher analog dazu *Bartonella* Adhäsion A (BadA) genannt wurde. BadA schützt *B. henselae* nicht nur vor Phagozytose, sondern vermittelt auch die Adhärenz an Proteine der EZM (z.B. Fibronectin und Kollagen). Außerdem scheint BadA auch an der Aktivierung von HIF-1 und der Induktion der VEGF-Sekretion in der Wirtszelle beteiligt zu sein [Riess *et al.*, 2004; Riess *et al.*, 2007].

Bei der Infektion kommt es an der Endothelzelloberfläche zur Ausbildung eines Invasoms (Ansammlung von Bakterien), das an der Zelle adhärert, und nach ca. zwei Stunden internalisiert wird. Nach 24 h kann man eine perinukleare Formation der Bakterien erkennen. So kann *B. henselae* Makrophagen, EZ und andere Zellen befallen [Dehio *et al.*, 1997; Fuhrmann *et al.*, 2001].

Für die Adhäsion und das intrazelluläre Überleben von *B. henselae* sind vor allem seine beiden Sekretionssysteme VirB/D4-TIVSS und Trw von Bedeutung [Rhombert *et al.*, 2004]. Während Trw bei der intraerythrozytären Infektion mitwirkt, vermittelt VirB/D4-TIVSS v.a. Wirkungen in EZ. Beim VirB/D4-TIVSS handelt es sich um einen Multiprotein-Kanal, der die innere Bakterienmembran mit der äußeren verbindet und durch Interaktion mit der EZ aktiviert werden kann. Es ermöglicht den Austausch von DNA, Proteinen sowie DNA-Protein-Komplexen und weist große Homologien zum TIVSS von *A. tumefaciens* auf. Dieses phylogene Bakterium schleust mit dessen Hilfe u.a. die Tumorinduzierende DNA in die Pflanzenzelle ein. Es konnten sieben Proteine beschrieben werden, die durch das TIVSS transportiert werden: Bep A-G. Sie vermitteln Prozesse wie die Inhibition der Apoptose, Entzündung und das *Rearrangement* des Zytoskeletts [Schulein *et al.*, 2005]. Zusätzlich kommt dem VirB-TIVSS eine tragende Rolle bei der NF- κ B-regulierten Reaktion der Wirtszelle zu, die sich in der Induktion von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1), IL-8 und anderen äußert [Fuhrmann, *et al.*, 2001; Schmiederer *et al.*, 2001, Schmid *et al.*, 2004]. Neben der Aktivierung von NF- κ B inhibiert *B. henselae* sowohl frühe als auch späte Abläufe der Apoptose in EZ. Dazu zählen die Hemmung der Kaspasenaktivität und die Hemmung der DNA-Fragmentierung [Kirby und Nekorchuk, 2002]. Inzwischen wurden weitere potentielle Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae* gefunden. So besitzt *B. henselae* schwach endotoxische Lipopolysaccharide (LPS), worüber es mit EZ interagieren kann. Mit ihnen ist das Bakterium in der Lage C3 zu binden, wodurch das Komplementsystem über den alternativen Weg aktiviert wird. Ebenso scheint die Einleitung des klassischen Weges ohne spezifische Antikörper möglich zu sein [Rodriguez-Barradas *et al.*, 1995; Zähringer *et al.*, 2004]. Häufig werden in den verschiedensten Bakterien einige Pathogenitätsfaktoren durch Fe²⁺ reguliert. So konnte vor wenigen Jahren auch ein die Eisenaufnahme regulierendes Protein (Fur) in *B. henselae* identifiziert werden. Etwas früher schon wurde der Einfluss von Hämin auf das Wachstumsverhalten von *B. henselae* dargestellt. Auch hier wurde ein entsprechendes Hämin-bindendes Protein identifiziert, das als Phagen-assoziiertes Protein (Pap31) bekannt ist [Zimmermann *et al.*, 2003; Kempf und Winkler, 2004].

Darüber hinaus senkt *B. henselae* die oxidative Funktion von polymorphkernigen Leukozyten [Fumarola *et al.*, 1994]. 1990 wurde ein Abschnitt im Genom entdeckt, der Ähnlichkeiten zu dem bereits bekannten Htr-A aufweist. Die Existenz eines solchen Proteins würde dem Bakterium intrazellulären Schutz vor oxidativer Zerstörung ermöglichen [Anderson *et al.*, 1996].

Abschließend sind in Abb. 1 die Pathogenitätsstrategien von *B. henselae* gezeigt. Insgesamt scheinen für die durch *B. henselae* induzierte proangiogenetische und antiapoptotische Wirtszellantwort vor allem seine OMPs, BadA und sein VirB-TIVSS als ursächliche Faktoren in Frage zu kommen.

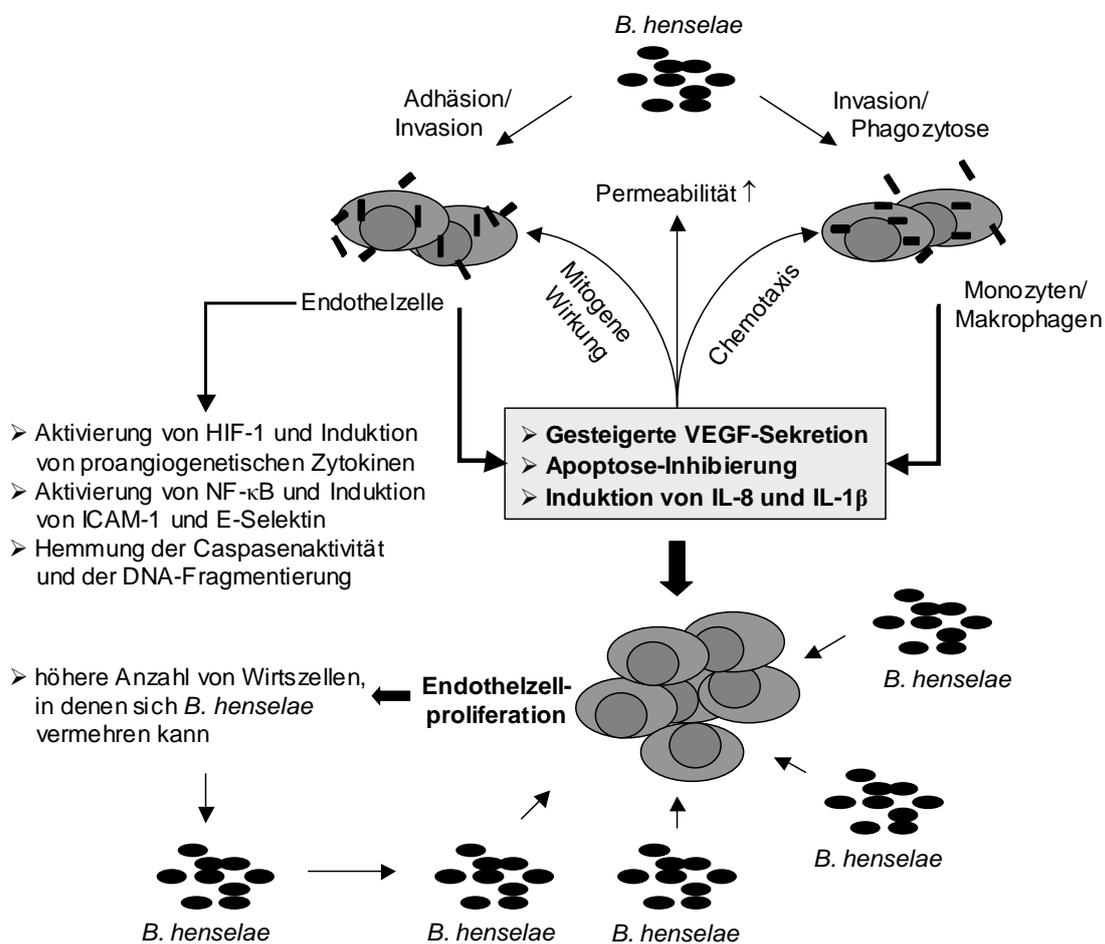


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wirtszellantwort bei einer *B. henselae*-Infektion. Mittels Adhäsion und Invasion infiziert *B. henselae* EZ und kann in der infizierten Zelle eine proangiogenetische sowie antiapoptotische Wirtszellantwort auslösen. Durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und NF- κ B kommt es zur Induktion von VEGF, IL-8 und anderen proangiogenetischen und antiapoptotischen Zytokinen. So stimuliert *B. henselae* die Angiogenese und induziert die EZ-Proliferation. In diesen neu gebildeten EZ kann sich *B. henselae* dann weiter vermehren. Abgesehen von EZ infiziert *B. henselae* auch andere Zellen (z.B. Makrophagen). Es wird angenommen, dass die Wechselwirkungen mit diesen Zellen synergistisch zu verstärkter Angiogenese führen und die Immunabwehr weiter eingeschränkt wird.

1.1.4 Die klinischen Manifestationen einer *B. henselae*-Infektion

B. henselae wird von Katzen durch Biss- oder Kratzverletzungen vor allem auf Kinder und Jugendliche übertragen, aber auch Flöhe und Zecken werden als mögliche Vektoren diskutiert [Kemper *et al.*, 1990; Zangwill *et al.*, 1993; Adal *et al.*, 1994]. Die Inzidenzrate und der Krankheitsverlauf hängen stark vom Immunstatus des Infizierten ab. So kommt es beim Immunschwachen nicht nur häufiger zur Manifestation, sondern auch zu schwereren Verläufen der Infektion, wobei die Bazilläre Angiomatose, Peliosis hepatis, Osteomyelitiden und Endokarditiden zu nennen sind. Ein Befall von anderen Strukturen, wie dem ZNS, scheint eher selten zu sein. Beim Immunkompetenten ist die Katzenkratzkrankheit die häufigste Form der *B. henselae*-Infektion. Oft werden auch rezidivierende Bakteriämien beobachtet, die von Fieber begleitet sein können [Lucey *et al.*, 1992; Regnery *et al.*, 1992a; Caniza *et al.*, 1995; Raoult *et al.*, 1996].

1.1.4.1 Katzenkratzkrankheit (KKK, *cat scratch disease*)

Erstmalig wurde diese oft gutartig verlaufende und selbstlimitierende Erkrankung 1950 beschrieben [Adal *et al.*, 1994]. Allerdings konnte ihr erst 1983 ein bakterieller Ursprung zugeschrieben werden [Wear *et al.*, 1983]. An der Biss- oder Kratzstelle entsteht nach 3-10 Tagen eine Papel, die sich nach ca. 6-12 Wochen spontan zurückbildet [Margileth *et al.*, 1984; Zangwill *et al.*, 1993; Raoult *et al.*, 1996]. Dem Primäraffekt folgt eine lokalisierte, eher indolente Vergrößerung der regionalen Lymphknoten, die über Monate hinweg bestehen bleiben kann. Begleitsymptome der Erkrankung sind neben Fieber, Kopf-, Hals- und Gliederschmerzen auch Übelkeit, Gewichtsverlust und eine Splenomegalie [Carithers, 1985; Koehler, 1995; Yoshida *et al.*, 1996; Anderson und Neumann, 1997; Verma *et al.*, 2001]. Beim atypischen Verlauf (ca. 10 %) werden Komplikationen, wie z.B. das Parinaud'sche okuloglanduläre Syndrom (6 %), eine Enzephalitis (2,4 %), zerebrale Arteritis, Radikulitis, Myelitis oder eine Polyneuritis beobachtet. Hier kann man im Liquor Antikörper gegen *B. henselae* finden. Als weitere Komplikationen können Pneumonien, eine Splenitis oder eine granulomatöse Hepatitis auftreten [Carithers und Margileth, 1991; Schwartzman, 1992; Golden, 1993; Margileth, 1993; Kempf *et al.*, 2001b].

1.1.4.2 Bazilläre Angiomatose (BA) und Peliosis hepatis (PH)

Vor allem Immunschwache, wie z.B. HIV-Infizierte, Alkoholiker oder unter immunsupprimierender Therapie stehende Patienten können bei der Infektion mit *B. henselae* an einer BA oder PH erkranken [Stoler *et al.*, 1983; Caniza *et al.*, 1995; Drancourt *et al.*, 1995]. Allerdings konnte die BA auch bei immunkompetenten Patienten beobachtet werden [Lucey *et al.*, 1992; Paul *et al.*, 1994; Fournier und Raoult, 1998]. Die BA wurde 1983 erstmalig als atypische Hautveränderung bei einem HIV-Patienten beschrieben. Heutzutage wird sie zu den AIDS-definierenden Erkrankungen gezählt. Ihr Krankheitsbild ist sehr variabel, wobei fast alle Organe betroffen sein können. Obwohl sich in der Hälfte der Fälle nur eine einzelne kutane Affektion findet, kann es bei der kutanen Form auch zu multipel verteilten Hautläsionen mit variablem Erscheinungsbild kommen (Abb. 2) [Szaniawski *et al.*, 1990; Koehler, 1995; Schwartz *et al.*, 1997].



Abb. 2: Bazilläre Angiomatose bei einem HIV-Patienten: Kutane Läsionen.

[http://edcenter.med.cornell.edu/Pathophysiology_Cases/HIV/Cutaneous_Manifestations/4976.gif]

Ca. 20 % der Patienten klagen über Abdominalschmerzen (abdominelle Form) und weitere 20 % über eine Lymphadenopathie. Aber auch die langen Knochen und das Knochenmark (ossäre Form), Herz, Leber und die Muskulatur können infiltriert sein [Shinella *et al.*, 1990; Haught *et al.*, 1993]. Hinzu kommen begleitende Symptome, wie z.B. Kopfschmerzen, Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Erbrechen und Gewichtsverlust [Adal *et al.*, 1994; Koehler, 1995].

Makroskopisch imponiert eine kleine rötlich-livide Papel, aus der sich ein schmerzhafter und gefäßreicher Knoten entwickelt, der schnell zu Blutungen neigt. Histologisch finden sich lobuläre kapilläre Gefäßproliferationen aus epitheloiden, teilweise atypischen EZ, die die Blutgefäße auskleiden und bis ins Lumen des Gefäßes hineinragen. Regelmäßig konnte man entzündliche Infiltrate finden, die Bakterien, neutrophile Granulozyten und leukozytoklastischen Debris enthielten [Adal *et al.*, 1994; Monteil *et al.*, 1994].

Bei der PH finden sich hingegen durch Gefäßproliferationen mit Blut gefüllte, zystenartige Kavernen, aus denen *B. henselae* isoliert werden kann [Koehler *et al.*, 1988]. Häufig wird die PH mit der BA assoziiert oder isoliert in HIV-Patienten gefunden. Die Patienten leiden an Abdominalschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe sowie Fieber und weisen oft eine Hepatomegalie, eine Splenomegalie oder bei Befall beider Organe eine Hepatosplenomegalie auf [Welch *et al.*, 1992; Fournier und Raoult, 1998].

1.1.5 Epidemiologie, Diagnostik und Therapie der *B. henselae*-Infektion

Bartonella spp. sind weltweit verbreitet. Man schätzt, dass bei 6-30 % der europäischen Bevölkerung Antikörper gegen *Bartonella* spp. nachweisbar sind [Harrison und Doshi, 1999].

Es gibt diverse Möglichkeiten eine *B. henselae*-Infektion nachzuweisen. In Biopsien von Hautläsionen können nach Anfärbung mit Eosin und Hämatoxylin Blutkapillaren mit reichlich vergrößerten EZ und Infiltrate aus Neutrophilen und Lymphozyten gefunden werden. Die Bartonellen selbst lassen sich mit Hilfe des Lysezentrifugationssystems aus Blutkulturen isolieren und mit der *Warthin-Starry-Silver* Färbung oder der Elektronenmikroskopie darstellen. Serologisch kann ein Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFA) *Bartonella*-spezifische IgG nachweisen [Adal *et al.*, 1994; Koehler, 1995]. Inzwischen wurden aber auch PCR-Verfahren entwickelt [Fournier *et al.*, 2002; Zeaiter *et al.*, 2003].

Die Therapie der Bartonellose variiert je nach Immunstatus des Patienten und Manifestation der Erkrankung. Während bei einem unkomplizierten Verlauf der KKK keine Therapie notwendig ist, kann sie mitunter bei Immunschwachen sehr langwierig sein. Zur Behandlung werden verschiedene Antibiotika, wie Clarithromycin, Azithromycin, Erythromycin sowie Tetracycline und Rifampizin eingesetzt [Rudikoff *et al.*, 1989; Relman *et al.*, 1990; Slater *et al.*, 1990; Welch *et al.*, 1992; Kempf und Winkler, 2004; Rolain *et al.*, 2004]. Studien ergaben, dass Komplikationen der KKK erfolgreich mit Gentamicin angegangen werden können [Raoult *et al.*, 1996]. Je nach Immunstatus muss die Behandlung bis zu zwei Monate und länger durchgeführt werden, wobei die Therapie bei Organmanifestationen intensiver durchzuführen ist [Adal *et al.*, 1994; Koehler, 1995].

1.2 Angiogenese

Angiogenese ist für die Entstehung des Gefäßsystems von großer Bedeutung und beschreibt die Gefäßneubildung aus bestehenden Gefäßen durch Kapillarsprossung. Angiogenese ist in verschiedenste physiologische und pathologische Abläufe integriert (Abb. 3). Aber auch im Rahmen von Infektionen, wie bei einer Bartonellose, spielt sie eine zentrale Rolle.

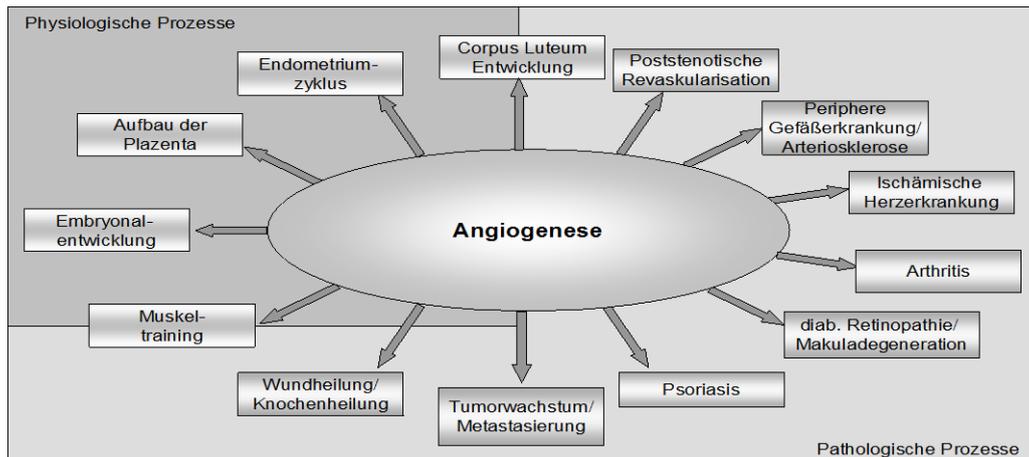


Abb. 3: Beispiele von physiologischer und pathologischer Angiogenese. Nach: Folkman & Haudenschild, 1980a/b; Findlay *et al.*, 1986; Folkman & Klagsbrun, 1987; Folkman, 1990; Koch *et al.*, 1994; Folkman, 1995; Hudlicka, 1998; Carmeliet & Jain, 2000; LeCouter *et al.*, 2001.

Die EZ durchlaufen während der Angiogenese die Phasen der Migration, Proliferation und Differenzierung, wobei der Wachstumsfaktor VEGF als einer der Hauptmediatoren angesehen wird [Folkman, 1984a/b]. Nach angiogener Stimulation verändern EZ ihre Morphologie und entwickeln Ausläufer. Durch proteolytische Enzyme (z.B. Matrix-Metalloproteinasen und Plasminogen-Aktivatoren) kommt es zur Lockerung der peri- und interendothelialen Zellkontakte und zum partiellen Abbau der Basalmembran sowie der EZM. In diesen Bereichen gestörter Integrität findet die Migration der EZ in den perivaskulären Raum statt, wo anschließend die Proliferation der Zellen erfolgt. Haben sich die Zellen zu einem Spross zusammengelagert, werden Verzweigungen und Anastomosen (*loops*) gebildet, bis ein kapillarähnliches Netz entsteht. Letztendlich führt die Rekrutierung von Perizyten und Fibroblasten zur Stabilisierung und zum Schutz des neuen Gefäßes [Gimbrone *et al.*, 1974; Ausprunk und Folkman, 1977; Folkman, 1984b; Findlay, 1986; Hirschi und D'Amore, 1996; Grant und Kleinman, 1997; Nicosia und Villaschi, 1999].

1.2.1 Der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1)

HIF-1 wird in vielen Zellen als Reaktion auf eine bestehende Hypoxie induziert. Aber auch Wachstumsfaktoren, NO, Thrombin, Angiotensin und mechanischer Stress regulieren HIF-1. Inzwischen ist auch eine Asparaginhydroxylase, ein Faktor der HIF-1 inhibieren kann, bekannt: *factor inhibiting hif* (FIH). Durch Induktion von verschiedenen angiogenetischen Faktoren, aber auch durch Stimulation der Glykolyse und Erythropoese kann HIF-1 auf die O₂-Homeostase im Gewebe Einfluss nehmen und dazu beitragen, sie aufrecht zu erhalten [Carmeliet *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2004a; Cummins und Taylor, 2005].

HIF-1 ist ein heterodimerer Komplex aus 2-Protein-Untereinheiten, der zur Familie der Per-Arnt-Sim (PAS) zählt. Es handelt sich um ein basisches *helix-loop-helix* Protein. Obwohl die α -Untereinheit stetig transkribiert und translatiert wird, ist sie nur unter Hypoxiebedingungen nachweisbar, was auf den schnellen Abbau bei Normoxie zurückzuführen ist. HIF-1 α besitzt eine Domäne, die sauerstoffabhängig modifiziert wird. In Anwesenheit von molekularem O₂ erkennen und degradieren Prolylhydroxylasen diese Domäne und es kommt zur Reaktion mit dem von-Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor (pVHL). Danach koppelt der HIF-1 α -VHL-Komplex an ein weiteres Protein an, was zu einer Verknüpfung von HIF-1 α mit Ubiquitin und zum proteosomalen Abbau führt. Bei Hypoxie hingegen kommt es zur Stabilisierung und Akkumulation von HIF-1 α , das in Richtung Nukleus transloziert und dort an HIF-1 β bindet (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*, ARNT). Dieses wird selbst nicht durch Hypoxie reguliert und liegt permanent im Zellkern vor. Die Wirkung des heterodimerisierten HIF-1 beruht auf der Bindung an transkriptionelle Verstärkerelemente (*hypoxia response elements*; HREs) bestimmter Gene, was zu einer Verstärkung der Promotorregion der betroffenen Gene führt. Es kommt aber auch zur Rekrutierung weiterer Co-Faktoren und letztendlich zu einer erhöhten Transkription dieser Gene. Solche Gene sind u.a. in Prozesse der Vasodilatation, der Glykolyse, der Angiogenese und der Sauerstoffsättigung involviert [Wang und Semenza, 1995; Wang *et al.*, 1995; Metzen *et al.*, 2003; Cummins und Taylor, 2005].

1.2.2 Zytokine

Zytokine sind lösliche Proteine mit einer kurzen Halbwertszeit, einem niedrigen Molekulargewicht (5-40 kDa) und wirken bereits in niedrigen Konzentrationen. Die Einteilung der Zytokine erfolgt nach ihrer Funktion während der Immunantwort. Maßgebliches Kriterium dabei ist die entzündungsinhibierende oder -induzierende Wirkung, wobei sie entweder als intrazelluläre Mediatoren fungieren oder durch Andocken an extrazelluläre auto- oder parakrine Rezeptoren bestimmte Prozesse initiieren. Indem Zytokine z.B. die Abwehr von Erregern regulieren und Immunzellen koordinieren, kontrollieren sie die Immunantwort. Dabei beeinflussen sie u.a. die Zellaktivierung, das Zellwachstum und die Zelldeaktivierung. Zytokine sind außerdem für die Regulation von Angiogenese, Apoptose oder für systemische Reaktionen wichtig. Dabei sind stets inhibierende und induzierende Zytokine in einem bestimmten Verhältnis vorhanden. Diese Balance bildet die Grundlage für den Beginn, die Effektivität und für das Ende einer Immunreaktion. Besteht ein Ungleichgewicht, kann es zu chronischen Erkrankungen kommen (z.B. Psoriasis, Rheumatoide Arthritis, M. Crohn). Das Wissen um die Wirkung der Zytokine gewann in den letzten Jahren so an Bedeutung, dass inzwischen versucht wird, es therapeutisch z.B. in der Tumorthherapie zu nutzen (z.B. IL-2, anti-VEGF-Antikörper und IFN α in der Therapie des Nierenzellkarzinoms, des NSCLC oder des kolorektalen Karzinoms). Neben dem Einsatz von Zytokinen ist zudem auch die Gabe von neutralisierenden Antikörpern und löslichen Rezeptoren möglich [Borgstrom *et al.*, 1998; Negrier *et al.*, 1998; Baggiolini, 2001; Yang *et al.*, 2003; Hicklin und Ellis, 2005; Kowanzetz und Ferrara, 2006]. In der vorliegenden Arbeit soll der Schwerpunkt nun vor allem auf angiogenetischen und antiapoptotischen Zytokinen liegen.

1.2.2.1 Der *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)

VEGF-A wurde 1983 als *vascular permeability factor* identifiziert und bildet zusammen mit VEGF-B bis -D und PlGF die VEGF-Familie [Senger *et al.*, 1983; Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Ferrara *et al.*, 2004]. VEGF-A zählt nicht nur zu den wichtigsten angiogenetischen Wachstumsfaktoren, sondern ist auch in der Ätiopathogenese der Bartonellose von Bedeutung [Kempf *et al.*, 2001a].

VEGF (VEGF-A) ist ein homodimeres Glykopeptid mit einer Masse von 45 kDa (VEGF₁₆₅). Das Gen liegt auf Chromosom 6p21.3 und ist in 8 Exons und 7 Introns organisiert [Ferrara und Henzel, 1989; Ferrara und Davis-Smyth, 1997]. Durch alternatives *Splicing* liegt VEGF, je nach Aminosäurenkettenlänge, in mehreren Isoformen vor. Von den vier häufigsten *Splicing*-Varianten VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ stellt VEGF₁₆₅ die prädominante Form dar [Ferrara und Davis-Smyth, 1997]. Es sind aber auch seltenere Isoformen, die z.B. bei Tumorprozessen oder Umbauprozessen exprimiert werden, bekannt (VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₂, VEGF₁₈₃, VEGF_{165b}). Auf den Exons 6 und 7 sind zwei unabhängige Heparinbindungsstellen lokalisiert. VEGF₁₂₁ besitzt keine der beiden und bindet somit nicht an Heparin. Da dem VEGF₁₆₅ nur Exon 6 fehlt, kann es noch an Heparin und an die Zelloberfläche bzw. an die EZM binden. VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ sind dagegen fast vollständig an der EZM verankert und besitzen ein geringeres angiogenetisches Potential. Sie können aber durch Heparin, Heparinase oder Plasmin von der EZM verdrängt werden, wobei u.a. auch das bioaktive Produkt VEGF₁₁₀ abgespalten werden kann (Abb. 4) [Park *et al.*, 1993; Ferrara, 1996; Ferrara, 2001; Ferrara, 2004]. Heparin wirkt vermutlich stabilisierend auf VEGF und schützt es vor Inaktivierung. So bindet z.B. geschädigtes VEGF₁₆₅ nach Zugabe von Heparin wieder an den flk-1-Rezeptor [Gitay-Goren *et al.*, 1992; Cohen *et al.*, 1995; Gitay-Goren *et al.*, 1996]. Außerdem scheinen VEGF-Heparan-Sulfat-komplexe zu einer effektiveren Signaltransduktion und EZ-Proliferation zu führen [Ferrara, 1999]. Die verschiedene Heparinbindungsfähigkeit der Isoformen beeinflusst die VEGF-Bioverfügbarkeit damit also grundlegend [Ferrara, 2004].

Die Abb. 4 zeigt eine schematische Darstellung von der Freisetzung des VEGF bis hin zu seinen Funktionen. Die VEGF-mRNA-Expression ist vom O₂-Partialdruck im Gewebe sehr stark abhängig [Minchenko *et al.*, 1994]. Sinkt er, wird HIF-1 aktiviert, welches an das *enhancer element* des VEGF-Genes bindet und zu dessen gesteigerten Transkription führt. Aber auch Tumorpromotoren, Hormone (Gonadotropine, TSH, ACTH), Wachstumsfaktoren (EGF, bFGF), inflammatorische Zytokine (IL-1 α , IL-6) und Glukosemangel können zur Induktion von VEGF führen [Heits *et al.*, 1998; Ferrara, 2004].

Primär ist es ein starkes Endothelzell-spezifisches Mitogen, aber VEGF₁₆₅ wird auch von Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, Myozyten, Fibroblasten, Epithelzellen, Pneumozyten, Hepatozyten, Osteoblasten, Beta-Zellen, primären hämatopoetischen Stammzellen und insbesondere von hochmalignen schnell proliferierenden Tumorzellen sezerniert. VEGF regt die Proliferation und die DNA-Synthese von EZ sowohl *in vivo* als auch *in vitro* an und stimuliert konfluente EZ, im Kollagengel kapillarähnliche Strukturen auszubilden [Pepper *et al.*, 1992; Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Benjamin *et al.*, 1999]. Insgesamt ist die VEGF-Basalsekretion essentiell für den Erhalt der Gefäße.

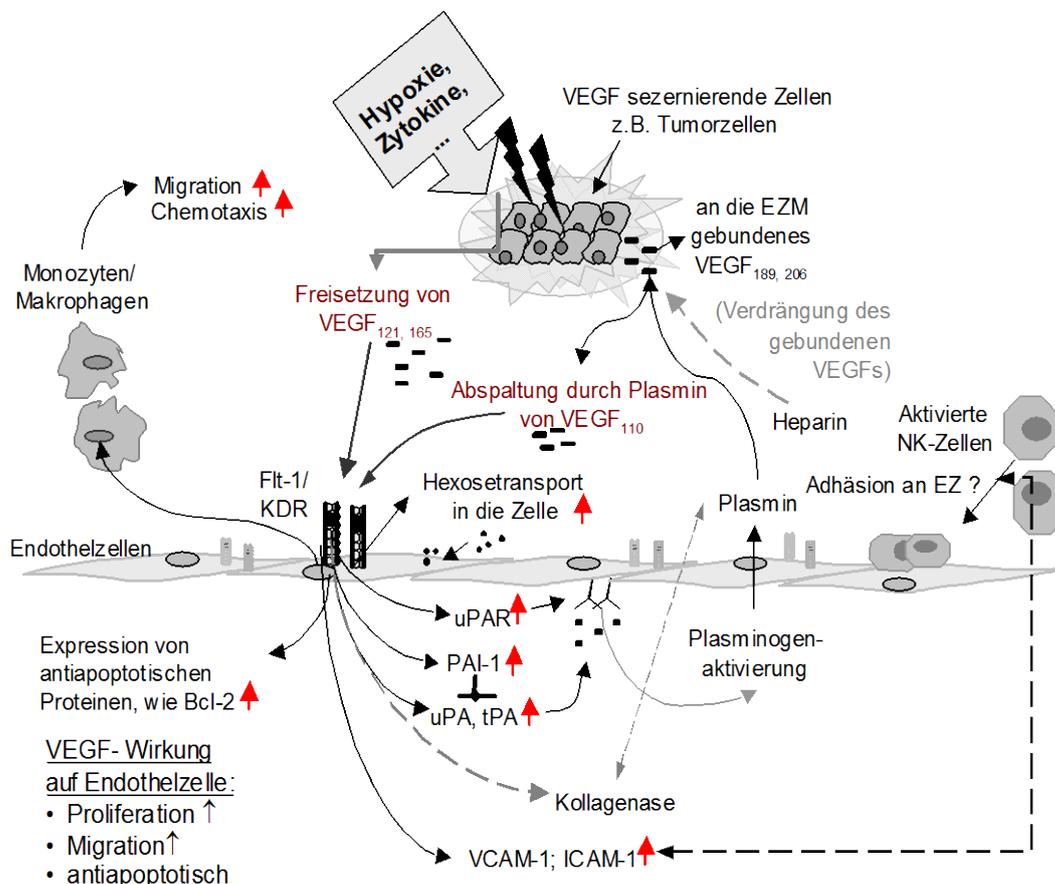


Abb. 4: Überblick über die Freisetzung und Funktionen von VEGF. Nach Stimulation z.B. durch Hypoxie sezernieren verschiedene Zellen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅. Nach Bindung an den Rezeptor (z.B. Flt-1 auf EZ) löst VEGF die jeweiligen z.T. zellspezifischen Reaktionen aus. So regt VEGF EZ zur Proliferation und Migration an und wirkt z.B. durch vermehrte Expression von Bcl-2 antiapoptisch auf EZ. In EZ induziert VEGF auch die Expression von PA-1 und PAR. Eine anschließende Plasminogenaktivierung kann dann z.B. zur weiteren Abspaltung von VEGF₁₁₀ aus membranständigen VEGF_{189, 206} führen. Dieser Prozess kann aber durch die ebenfalls mögliche Expression des PA-Inhibitors-1 limitiert werden. Außerdem kann VEGF durch Induktion des Hexosetransportes in die EZ deren Zellstoffwechsel erhöhen. Monozyten werden durch VEGF zu vermehrter Migration und Chemotaxis in das umliegende Gewebe angeregt. Zusätzlich kann die durch VEGF induzierte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 eine Adhäsion von NK-Zellen an EZ bewirken. Nach: Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Ferrara, 2004.

VEGF induziert den Transport von Hexose in die Gefäßendothelzelle und erhöht zudem die Expression von VCAM-1 und ICAM-1. Diese Adhäsionsmoleküle (CAMs, *cell adhesion molecules*) sind sowohl für interzelluläre Kontakte als auch für die Immunreaktion sehr wichtig. So ermöglichen sie es, dass EZ mit Lymphozyten interagieren können [Pekala *et al.*, 1990; Pepper *et al.*, 1991; Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Ding *et al.*, 2003]. VEGF führt in EZ auch zu einer gesteigerten Expression von antiapoptotischen Genen, wie z.B. Bcl-2. Der antiapoptotische Effekt wird dabei durch die PI3-Kinase und die Akt-Kaskade vermittelt [Gerber *et al.*, 1998; Ferrara, 2001; Chavakis und Dimmeler, 2002]. VEGF stellt ein potentes Chemotaxin für Monozyten dar, kann aber auch mit anderen Zytokinen, wie dem TNF- α interagieren [Koch *et al.*, 1994]. Im Rahmen der Entzündung wirkt VEGF vor allem auf die polymorphkernigen Neutrophilen und die Monozyten/Makrophagen, wobei es in diesen nach Stimulation mit VEGF, wie auch nach Stimulation mit anderen Chemotaxinen, zu einer flüchtigen Erhöhung des zytosolischen Kalziums kommt [Barleon *et al.*, 1996].

VEGF ist besonders zusammen mit Angiopoetin 2 (Ang2) bei der Tumorangio-genese wichtig. Tumorzellen können die Gefäßregression umgehen und Angiogenese induzieren. Kurze Zeit nach der Tumorentstehung exprimieren umliegende Gefäße Ang2. Als eine Art Marker wirkt es auf die assoziierten Gefäßendothelien und kann sie destabilisieren. Kommt es zur Regression dieser Gefäße, wird das Areal von der Blutzufuhr abgeschnitten und Hypoxie entsteht.

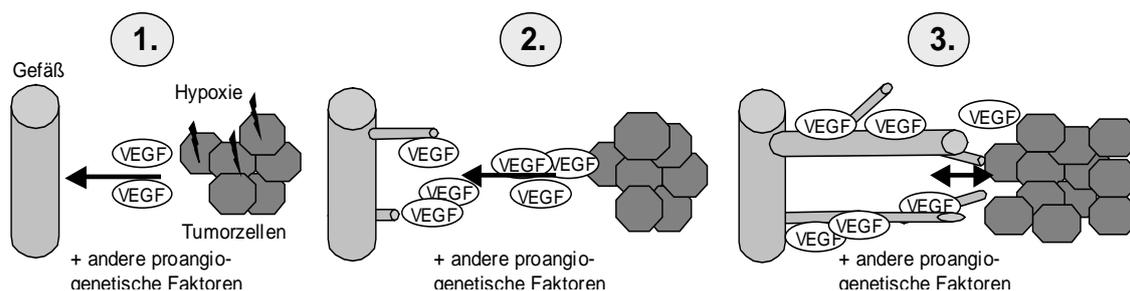


Abb. 5.1-5.3: Tumorangio-genese. 1. „Junge Tumore“ ($\varnothing < 2$ mm) sind zunächst nicht an das Gefäßnetz angeschlossen. Als Reaktion auf das „gestörte“ Gewebe kommt es sogar zur Regression der umliegenden Blutgefäße. Durch die entstandene Hypoxie werden Tumorzellen angeregt vermehrt proangiogenetische Faktoren, insbesondere VEGF zu sezernieren. 2. VEGF stimuliert die angiogene Sprossung der Gefäße in Richtung Tumorgewebe. 3. Dabei wachsen neue Gefäße in den Tumor hinein und sichern ihm das Überleben und das weitere Wachstum. Ein Anschluss an das Blutsystem erhöht zudem die Wahrscheinlichkeit für eine hämatogene Streuung der Tumorzellen und für die spätere Metastasierung. Nach: Paku, 1998; Yancopoulos *et al.*, 2000.

Dadurch wird wiederum die Expression von VEGF besonders in potenten Tumorzellen induziert, was letztendlich zur Stimulation der Angiogenese führt. Neue Kapillarsprossen dringen in das Gewebe ein und ermöglichen dem Tumor Wachstum und Metastasierung (Abb. 5.1-3) [Paku *et al.*, 1991; Dvorak *et al.*, 1995; Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Paku, 1998; Yancopoulos *et al.*, 2000].

1.2.2.2 Die VEGF-Rezeptoren: Ihre Struktur und ihre Funktionen

Es gibt drei zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase gehörende VEGF-Rezeptoren: VEGFR-1 (*fms-like-tyrosine kinase*, Flt-1), VEGFR-2 (*murin: fetal liver kinase*, Flk-1; *human: kinase insert domain containing receptor*, KDR) und VEGFR-3 (Flt-4) [De Vries *et al.*, 1992; Galland *et al.*, 1992; Terman *et al.*, 1992; Shibuya *et al.*, 1999]. Allerdings binden nur die ersten zwei alle *Splicing*-Varianten von VEGF-A mit hoher Affinität. Zudem existiert ein mit dem humanen Neutropillin-1 identischer Rezeptor, der in Gegenwart von VEGFR-2 die Bindung von VEGF₁₆₅ verstärkt und die Effektivität der Signaltransduktion erhöht [Soker *et al.*, 1998; Ferrara, 2001]. Bindet VEGF an den Rezeptor, wird der im nicht-aktivierten Zustand als Monomer vorliegende Rezeptor dimerisiert und es kommt zur Bindung von Signalproteinen, wodurch die Signalkaskade eingeleitet wird. Zu diesen Proteinen zählen die PCL- γ , die PKC, die PI3-Kinase und Moleküle aus der Signalkette von Ras [Terman *et al.*, 1992; Millauer *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 1995; Ferrara, 1996; Siemeister *et al.*, 1998a]. Proliferierende EZ exprimieren sowohl VEGFR-1 als auch VEGFR-2. Makrophagen, Monozyten und Trophoblasten können aber nur VEGFR-1 und hämatopoetische Zellen nur VEGFR-2 exprimieren [Kato *et al.*, 1995; Barleon *et al.*, 1996]. Tumorzellen exprimieren nach Stimulation durch VEGF, bFGF und anderen Zytokinen wiederum VEGFR-1 und -2 [Gitay-Goren *et al.*, 1993; Marmé, 1998]. Insgesamt ist die Zellantwort nach Bindung an den Rezeptor allerdings bei beiden Rezeptoren von der Zellart und der Zellentwicklung abhängig [Ferrara, 2004].

Bindet VEGF an VEGFR-2 von EZ, werden Angiogenese, Mitogenität, Proliferation, Chemotaxis, Permeabilität, die Expression von Proteasen und die NO-Freisetzung sowie in HUVEC antiapoptotische Effekte stimuliert [Heits *et al.*, 1998; Kroll und Waltenberger, 1999; Kroll und Waltenberger, 2000].

Eine Aktivierung des VEGFR-1 führt hingegen zur Morphogenese sowie zur Produktion der Plasminogenaktivatoren tPA und uPA. Außerdem werden Monozyten zur Migration angeregt [Pepper *et al.*, 1991]. Vermutlich stellt VEGFR-1 ein Filter für die VEGF-Regulierung am Gefäßsystem dar. Es deutet viel darauf hin, dass die Aktivierung von VEGFR-1 die VEGFR-2-abhängige EZ-Proliferation inhibiert und die EZ-Migration beeinträchtigt [Kendall *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 2001; Ferrara, 2004]. In der VEGFR-1-Promotorregion wurde zudem - im Gegensatz zum VEGFR-2 - ein *hypoxia inducible enhancer element* für HIF-1 gefunden, was für die Regulierung unter Hypoxie sprechen könnte [Ferrara, 1996; Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Gerber *et al.*, 1997].

1.2.2.3 Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 gehört zur Familie der CXC-Chemokine, wobei das Molekulargewicht des nicht-glykolysierten IL-8 8,4 kDa beträgt. Aus dem ursprünglichen Präcursorprotein mit 99 AS entstehen diverse aktive Isoformen mit 69-79 AS, wobei das von Immunzellen gebildete Peptid mit 72 AS die dominierende Form darstellt. Von Nicht-Immunzellen wird überwiegend eine aus 77 AS bestehende Isoform gebildet. Nach Stimulation (z.B. durch NF- κ B) wird IL-8 von verschiedenen Zelltypen (z.B. Immunzellen, EZ, Epithelzellen, Hepatozyten, etc.) synthetisiert, wobei die Freisetzung aus der Zelle meist durch TNF- α , IL-1 aber auch durch Hypoxie stimuliert wird [Koong *et al.*, 1994; Brat *et al.*, 2005]. Seine Funktionen als Chemotaxin oder innerhalb der Angiogenese, vermittelt IL-8 nach Bindung an die Rezeptoren CXCR1, CXCR2 und DARC (*Duffy antigen receptor for cytokines*), während es insbesondere auf Lymphozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten wirkt [Yoshimura und Leonard, 1990; Baggiolini, 2001]. IL-8 kann während vielen biologischen Prozessen synthetisiert werden, wobei seine Hauptfunktion in der Regulation der Immunantwort liegt. Allerdings wirkt IL-8 auch als chemotaktischer und proliferativer bzw. proangiogenetischer Stimulus auf HUVEC und scheint zudem auch das Gesamtüberleben von EZ im Sinne einer Apoptoseinhibition zu erhöhen. Des Weiteren deutet sich an, dass IL-8 ebenfalls bei der Tumorentstehung und Progression eine Rolle spielt [Koch *et al.*, 1992; Strieter *et al.*, 1992; Brat *et al.*, 2005].

1.3 Apoptose

In der Entwicklung von Geweben spielt Apoptose eine große Rolle und ist unabdingbar für die erfolgreiche Ausdifferenzierung sowie Homöostase von Geweben, da so funktionsunfähige oder alte Zellen eliminiert werden können. Als „aktiver“ Prozess läuft die Apoptose ohne Entzündungsreaktion nach einem festen genetischen Programm ab [Arends und Wyllie, 1991; Kroemer *et al.*, 1995]. Je nach Zelltyp, Störung und Differenzierungsgrad gibt es verschiedene Wege, durch die Apoptose induziert wird, wobei man zwischen intrinsischen (Zellalter, Wegfall von Wachstumsfaktoren, etc.) und extrinsischen (Zytokine, Zytostatika, Bakterien, etc.) Signalen unterscheidet. Auch für das Immunsystem ist Apoptose sehr wichtig. Wird ihr Ablauf hier gestört, können sich Autoimmunerkrankungen entwickeln. Zudem können auch Neoplasien und degenerative ZNS-Erkrankungen auf fehlerhafte apoptotische Vorgänge zurückgeführt werden [Peter *et al.*, 1997; Mallat und Tedgui, 2000; Yuan und Yankner, 2000].

Durch die typische Morphologie kann Apoptose von der Nekrose unterschieden werden. Zu diesen Kriterien zählen: Chromatin-Kondensation, Fragmentierung von DNA und RNA, das „*membrane blebbing*“, die Umstrukturierung des Zytoskeletts und schließlich die Zellschrumpfung [Arends und Wyllie, 1991; Cohen *et al.*, 1994]. Sowohl die apoptotische Zelle als auch die sogenannten *apoptotic bodies*, die gebildet wurden, werden phagozytiert [Wyllie *et al.*, 1980]. In der Vergangenheit wurden immer wieder neue Mechanismen der Apoptoseregulation beschrieben. Nennenswert sind dabei die pro- und antiapoptotischen Proteine der bcl-2-Familie, die Caspasen, apoptosespezifische Proteasen und Moleküle, die mit diesen Proteinen assoziiert sind, wobei der Expression dieser Proteine eine große Bedeutung zukommt [Mallat und Tedgui, 2000].

Einige Bakterien (z.B. Yersinien, Salmonellen, Shigellen) sind fähig, die Apoptose in eukaryontischen Zellen auszulösen [Zychlinsky *et al.*, 1992; Monack *et al.*, 1996; Ruckdeschel *et al.*, 1998]. Sie aktivieren u.a. die Apoptose in Makrophagen und besitzen damit einen Überlebensvorteil. Auch eine infizierte Zelle selbst kann Apoptose induzieren, um Bakterien die Grundlage für ihre Vermehrung und Ausbreitung zu nehmen. Freigesetzte Bakterien und Zellrückstände werden dann von anderen Abwehrzellen erkannt und phagozytiert.

Wie andere intrazelluläre Bakterien (z.B. Chlamydien und Mykobakterien) kann *B. henselae* die Apoptose in bestimmten Zellen inhibieren und damit seine Wachstumsbedingungen extrem verbessern [Durrbaum-Landmann *et al.*, 1996; Airene *et al.*, 2002; Schairer, 2004]. Würde das Bakterium durch die Apoptose der Wirtszelle freigesetzt, wäre es nicht mehr vor der resultierenden Immunantwort geschützt und müsste folglich grundlegende Überlebensvorteile einbüßen.

1.3.1 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Der *nuclear factor- κ B* spielt bei der Immunantwort, Stress, Zellentwicklung, Apoptose und Onkogenese eine große Rolle. Die Proteine der NF- κ B-Familie verfügen über eine Rel-Domäne und werden in zwei Gruppen unterteilt. Zur ersten Gruppe gehören die transkriptiv aktiven Proteine p65 (RelA), RelB und c-Rel. Die zweite Gruppe wird aus p50 und p52 bzw. aus ihren Vorläuferproteinen p100 und p105 gebildet. Erst wenn diese mit Vertretern der ersten Gruppe Komplexe ausbilden, können sie transkriptiv wirken. NF- κ B selbst wird aus dem transkriptiven Heterodimer p50-p65 (p50-RelA) gebildet. In nichtstimulierten Zellen liegen NF- κ B-Moleküle als Mono- oder Heterodimere an ein Repressormolekül (I κ B) gebunden im Zytosol vor. Die eigentliche NF- κ B-Synthese erfolgt ATP-abhängig nach der Stimulation der Zelle. NF- κ B transloziert dann zum Nukleus, wo es Promotorregionen von Zielgenen aktiviert. So kontrolliert NF- κ B die Expression von diversen Zytokinen, Immunrezeptoren, Chemokinen und Zelloberflächenadhäsionsmolekülen. Es sind über 150 Signale (z.B. virale und bakterielle Proteine, UV-Licht, Zytokine) bekannt, die zu einer NF- κ B-Aktivierung durch Dissoziation von I κ B führen. Auch Hypoxie scheint über Src und die Ras/Raf-Kaskade, zu einer NF- κ B-Aktivierung zu führen. Zu den Zielgenen des hypoxieinduzierten NF- κ B zählen COX-2, TNF- α , MIP-2, IL-6 und IL-8. Die genannten Interleukine wirken z.B. über eine VEGF-Stimulation ebenfalls proangiogenetisch. NF- κ B-Transkriptionsfaktoren können Apoptose regulieren, wobei antiapoptotische (z.B. RelA) und proapoptotische (z.B. c-Rel in bestimmten Zelltypen unter bestimmten Konditionen) Funktionen kontrovers diskutiert werden. Obwohl NF- κ B (p50-p65) durch Induktion von antiapoptotischen Genen (z.B. IAPs) primär als Apoptoseinhibitor gilt, wurden bereits Signalkaskaden be-

schrieben, bei denen die NF- κ B-Aktivierung ein wichtiger Schritt zur Apoptose-induktion zu sein scheint (TNFR/TRADD- und FAS/FADD-Signalkaskade). Die genaue Funktion von NF- κ B konnte in diesem Kontext aber bisher noch nicht vollständig geklärt werden [Koch *et al.*, 1992; Koong *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Gomez *et al.*, 1997; Karin und Ben Neriah, 2000; Lia und Stark, 2002; Kreuz *et al.*, 2004; Cummins und Taylor, 2005].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten vorhandene Daten zur Stimulation der Angiogenese und Inhibition der Apoptose durch *B. henselae* in den befallenen Wirtszellen detaillierter beleuchtet werden. Ein Schwerpunkt wurde dabei auf die Induktion des Wachstumsfaktors VEGF und dessen bekanntesten *Splicing*-Varianten in verschiedenen Zellen gelegt. Zusätzlich sollte auch die Induktion von IL-8 untersucht werden. Die dabei aufgestellte Zeitkinetik der Zytokininduktion auf mRNA-Ebene sollte die Grundlage für die Durchführung von Genarray-Experimenten darstellen. Diese wurden sowohl mit *B. henselae* infizierten HeLa-229 Zellen als auch mit HUVE-Zellen durchgeführt, um das durch das Bakterium ausgelöste Genexpressionsmuster zu identifizieren.

Ein zweites Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von *B. henselae* auf die Viabilität infizierter Zellen zu untersuchen. Dabei sollte zum einen kontrolliert werden, ob *B. henselae* spezifisch auf die infizierten Zellen einwirkt oder ob sich die Pathogenität mit anderen Bakterien vergleichen lässt. Zum anderen sollte herausgearbeitet werden, ob und inwiefern die eigene Viabilität von *B. henselae* mit derer der infizierten Zellen zusammenhängt. In beiden Fällen untersuchte man parallel die VEGF-Proteinsekretion, um das Verhältnis zwischen der VEGF-Sekretion und dem Viabilitätsverhalten von infizierten Zellen besser zu verstehen. Die Ergebnisse der Viabilitätsexperimente sollten dann mit Experimenten zur Apoptoseinduktion bzw. -inhibition komplettiert werden.

Insgesamt sollte diese Arbeit somit dazu beitragen, die Einflüsse von *B. henselae* auf die Angiogenese und die Apoptose der befallenen Wirtszelle aufzuklären. Übergeordnetes Ziel war dabei, die gewonnenen Ergebnisse mit bereits vorliegenden Erkenntnissen der Bartonellen-Forschung zu vernetzen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tab. 1: Geräte

Analysenwaage BP610, PT1200	Sartorius, Göttingen
Brutschrank: BBD 6220	Heraeus, Hanau
<i>ELISA Reader</i>	Tecan, Crailsheim
Eppendorfpipetten und Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Geldokumentation: Fluor-S Multimager Biometra Ti5	BioRad, München Biometra, Göttingen
Software: <i>Quantity One</i> BioDoc Analyze	BioRad, München Biometra, Göttingen
Gelelektrophorese: Power Pac 200 und 1000	BioRad, München
Konfokales Laserscan-Mikroskop: Leica DM IRE 2	Leica, Bensheim
Software: Photoshop 6.0	Adobe Systems, Mountain View, CA USA
Mikroskope	Zeiss, Jena
Mikrowellenherd: Micromat	AEG, Frankfurt a.M.
Neubauer-Zählkammer	Superior, Lauda-Königshofen
PCR-Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
PCR-Thermocycler	Biometra, Göttingen
PH-Elektrode	WTW, Weilheim
Photometer: Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia, Freiburg
Schüttelinkubatoren	Infors AG, Bottmingen
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifugen: Eppendorf 5417R Multifuge 3 S-R Biofuge stratus Sorvall RC 5C Plus MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau Sorvall, Hamburg Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Memmert, Schwabach

2.1.2 Weitere Materialien

Tab. 2: Materialien

Einmalküvetten, Pipettenspitzen (1000 µl)	Sarstedt, Berlin
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
Pipettenspitzen (10 µl)	Gilson, WI, USA
Pipettenspitzen (200 µl)	Brand, Wertheim

Soweit nicht anders als in Tab. 2 aufgeführt, wurden alle weiteren Plastik- bzw. Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen: Eppendorf, Hamburg; Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg; Greiner, Nürtingen; Nunc, Roskilde, Dänemark und Sartorius, Göttingen.

2.1.3 Chemikalien

Tab. 3: Chemikalien

Agarose, β -Mercaptoethanol, DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol-2HCl), DEPC-H ₂ O, Essigsäure, Ethanol, Glycerol, Isopropanol, Methanol, NaCl, NaOH	E. Merck, Darmstadt
Bromphenolblau, EDTA, Ethidiumbromid, Formaldehyd-Sol37 %, Formamid, PDTC (Pyrrolidindithiocarbamat), PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat), Triton-X, Trizma Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Collagen G, Natriumpyruvat, PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
DNTPs	Roche, Greznach-Wyhlen
5x-Buffer, Oligo-dT	Roche, Mannheim
DTT, Glutamin, Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Fluorprep	BioMerieux, Marcy l'Etoile; Frankreich
Glycin	Roth, Karlsruhe
Substanz A (Streptavidin), Substanz B (Biotin-alkalische Phosphatase)	Dako, Neuss

2.1.4 Oligonukleotide

Tab. 4: Übersicht über die in der PCR verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3') (<i>forward</i>) Sequenz (3' → 5') (<i>reverse</i>)	Gen	Quelle/ Herkunft
β -Aktin (<i>forward</i>)	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA	β -Aktin	Qiagen, Hilden (Kempf <i>et al.</i> , 2001a)
β -Aktin (<i>reverse</i>)	TAG AAG CAT TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG	β -Aktin	
VEGF Primer A (<i>forward</i>)	TCC AGG AGT ACC CTG ATG AG	VEGF gesamt	Morii <i>et al.</i> , 1993; Grutzkau <i>et al.</i> , 1998
VEGF Primer A (<i>reverse</i>)	ATT CAC ATT TGT TGT GCT GT	VEGF gesamt	
VEGF Primer B (<i>forward</i>)	CGA AGT GGT GAA GTT CAT GGA TG	VEGF _{121,165,189, 206}	
VEGF Primer B (<i>reverse</i>)	TTC TGT ATC AGT CTT TCC TGG TGA G	VEGF _{121,165,189, 206}	
IL-8 (<i>forward</i>)	ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT CTC	Interleukin 8	diese Arbeit
IL-8 (<i>reverse</i>)	TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C	Interleukin 8	diese Arbeit

Tab. 5: Übersicht über die in der *real-time*-PCR verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3') (<i>forward</i>) Sequenz (3'→ 5') (<i>reverse</i>)	Gen	Quelle
VEGFex3 (<i>forward</i>)	CCC TGA TGA GAT CGA GTA CAT CTT	VEGF ₁₆₅	Wellmann <i>et al.</i> , 2001
VEGFex8 (<i>reverse</i>)	ACC GCC TCG GCT TGT CAC	VEGF ₁₆₅	
VEGFex7ex5 (<i>reverse</i>)	AGC AAG GCC CAC AGG GAT TT	VEGF ₁₆₅	
TM VEGFex3	ATC CTG TGT GCC CCT GAT GCG ATG CCG T	VEGF ₁₆₅	
β2-Mikroglobulin (<i>forward</i>)	GAT GAG TAT GCC TGC CGT GTG	β2-Mikroglobulin	Wellmann <i>et al.</i> , 2001
β2-Mikroglobulin (<i>reverse</i>)	CAA TCC AAA TGC GGC ATC T	β2-Mikroglobulin	
β2-Mikroglobulin TM	CCT CCA TGA TGC TTA CAT GTC TCG ATC CC	β2-Mikroglobulin	
G-6-DPH	G-6-PDH <i>LightCycler Primer Set</i>	Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase	Roche, Mannheim
IL-8	IL-8 <i>LightCycler Primer Set</i>	Interleukin 8	

2.1.5 Antibiotika und Enzyme

Tab. 6: Antibiotika und Enzyme

Ampicillin	ICN Biomedicals, Eschwege
Gentamicin	Biochrom, Berlin
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin	Biochrom, Berlin
Streptomycin	Biochrom, Berlin
Reverse Transkriptase: <i>SuperScript II</i> (200U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Roche, Mannheim

2.1.6 Bakterienstämme

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

<i>Bartonella henselae</i> Marseille	Drancourt <i>et al.</i> , 1996
<i>Bartonella henselae</i> Pilus-negative Spontanvariante	Kempf <i>et al.</i> , 2001a
<i>Yersinia enterocolitica</i> pYV ⁻ (WAC)	Heesemann <i>et al.</i> , 1987
<i>Yersinia enterocolitica</i> pYV ⁺ (WAP)	Heesemann <i>et al.</i> , 1987
<i>Escherichia coli</i> HB 101	Boyer <i>et al.</i> , 1969
<i>Escherichia coli</i> HB 101 inv ⁺ (exprimiert das <i>Yersinia enterocolitica</i> Invasin)	Schulte, 1998
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33216	Bibb <i>et al.</i> , 1983
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD serotype 1/2a	Autenrieth <i>et al.</i> , 1992

2.1.7 Medien

Die Medien (Tab. 8) für die Zellkultur wurden steril angesetzt und bei 4 °C gelagert. FCS wurde vor Benutzung 30 min bei 60 °C im Wasserbad inaktiviert.

Tab. 8: Übersicht über die in der Zellkultur verwendeten Medien

<p><u>Zellkulturmedium für HeLa-Zellen:</u> 500ml RPMI 1640 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin</p>	<p>Gibco BRL, Biochrom Sigma Gibco-Invitrogen Corp. Gibco-Invitrogen Corp.</p>
<p><u>Zellkulturmedium für HUVE-Zellen:</u> Mit Antibiotikum EC Growth Medium SupplementMix C-39215 komplett 10 % FCS Ohne Antibiotikum Endothel Cell Growth Basal Medium 10 % FCS Collagen G</p>	<p>Promocell Promocell Sigma Promocell Sigma Biochrom AG</p>
<p><u>Zellkulturmedium für Mono Mac 6-Zellen:</u> Ohne Supplement 500 ml RPMI 1640 Medium 1 % nicht-essentielle Aminosäuren 1 % (2 mM) L-Glutamin 1 % (1 mM) Natriumpyruvat 1% Penicillin/Streptomycin 10 % FCS Mit Supplement 500 ml RPMI 1640 Medium OPI Media Supplement 2 mM L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin 10 % FCS Vor Zugabe von FCS sterile Filtration!</p>	<p>Biochrom AG Biochrom AG Gibco Invitrogen Corp. Biochrom AG Gibco-Invitrogen Corp. Sigma Biochrom AG Sigma Gibco-Invitrogen Corp. Gibco-Invitrogen Corp. Sigma</p>
<p><u>Zellkulturmedium für EA.hy 926-Zellen:</u> Mit Antibiotikum (zum Expandieren etc.): Clicks/RPMI 1640 1 % nicht-essentielle Aminosäuren 1 % (2 mM) L-Glutamin 1 % (1 mM) Natriumpyruvat 1% Penicillin/Streptomycin 10 % FCS Ohne Antibiotikum, ohne FCS (Infektions- experimente, VEGF-Induktion): Clicks/RPMI 1640 1 % nicht-essentielle Aminosäuren 1 % (2 mM) L-Glutamin, 1 % (1 mM) Natriumpyruvat</p>	<p>Biochrom AG Biochrom AG Gibco-Invitrogen Corp. Biochrom AG Gibco-Invitrogen Corp. Sigma Biochrom AG Biochrom AG Gibco-Invitrogen Corp. Biochrom AG</p>
<p><u>Einfrriermedium für Zellen:</u> RPMI 1640 10 % DMSO 50 % FCS</p>	<p>Gibco BRL, Biochrom AG Roth Sigma</p>

Tab. 9: Übersicht über die in der Bakterienkultur eingesetzten Medien

Columbia-Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut	Becton-Dickinson, Heidelberg
Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; 1 l H ₂ O dest., pH 7,5
<i>Legionella-buffered charcoal yeast extract</i> (B.C.Y.E.) α-Ketoglutarat Agar	Heipha Diagnostika, Heidelberg 2 g Aktivkohle; 10 g Hefeextrakt; 10 g ACES/Puffer; 250 mg Fe-Phosphat (pH 6,9); 1 g Ketoglutarat; 400 mg L-Cystein; 17 g Agar; ad. 1 l H ₂ O _{dest.} , pH 7,5
<i>Brain-heart-infusion</i> Medium	Becton-Dickinson, Heidelberg
Einfriermedium für Bakterien	20 % Glycerol in LB-Medium

2.1.8 Kits

Bei der Verwendung von Kits und Enzymen wurden die jeweils von der Herstellerfirma mitgelieferten Pufferlösungen verwendet.

Tab. 10: Übersicht über die verwendeten Kits

Apoptotic DNA Ladder Kit	Roche, Mannheim
RNeasy Kit	Qiagen
Cell Titer 96 [®] AQueous <i>Non-Radioactive Cell Proliferation Assay</i>	Promega
Für die real-time-PCR am <i>LightCycler</i> System: IL-8, G-6-PDH <i>LightCycler-Primer Set</i> <i>LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I</i>	Roche, Search LC Roche, Mannheim

2.1.9 IL-8- und VEGF-ELISA

Tab. 11: Übersicht über die im IL-8- und VEGF-ELISA verwendeten Puffer

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 x 6H ₂ O pH 9,8 mit 500 ml Aqua bidest. auffüllen
	Konjugat	4,5 µl Streptavidin 4,5 µl Biotin-alkalische Phosphatase 491 µl PBS für 30 min inkubieren und anschlies- send mit PBS auf 25 ml auffüllen
	Entwicklerlösung	1 mg PNPP/ml Substratpuffer
VEGF- ELISA	Quantikine Human VEGF-Immunoassay	Firma R&D Systems, Wiesbaden
	Duo Set ELISA Development System human VEGF	Firma R&D Systems, Wiesbaden

2.1.10 Zusätzlich verwendete Materialien und Chemikalien

Tab. 12: Zusätzlich verwendete Chemikalien und Materialien

BSA (bovine serum albumine)	Biomol, Hamburg
DNA-Leiter 1 kb Plus	Biomol, Hamburg
RNAsin (40 U/ μ l)	Promega, Madison, USA
RNase Away	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
<i>Human Genome 95Av2 microarray</i>	Affymetrix, High Wycombe, UK

2.2 Methoden - Bakterien

2.2.1 Anzucht von Bakterienkulturen für *in vitro* Infektionen

Für die Infektionsexperimente wurden neben *B. henselae* Marseille Wildtyp auch *Yersinia enterocolitica* pYV⁻ (WAC), *Yersinia enterocolitica* pYV⁺ (WAP), *Escherichia coli* HB 101, *Escherichia coli* HB 101 inv⁺, *Legionella pneumophila* ATCC 33216 und *Listeria monocytogenes* verwendet.

B. henselae wurden auf Columbia-Agar-Platten mit 5 % Schafsblut ausgestrichen und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit bebrütet. Nach 5 Tagen wurden die Bakterien abgeerntet, mit Luria-Bertoni-Medium gewaschen, aliquotiert und in Einfriermedium resuspendiert, um sie bei -80 °C lagern zu können. Zur Kontrolle der Bakterienzahl wurden serielle Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension ausplattiert und nach 10 Tagen ausgezählt. Für ein Experiment wurden die Bakterien aufgetaut, mit Medium gewaschen und die gewünschte Konzentration eingestellt. Auch hier diente das serielle Ausplattieren zur Überprüfung der tatsächlich verwendeten Keimzahl.

Y. enterocolitica pYV⁻ (WAC) und pYV⁺ (WAP) wurden über Nacht auf mit 10 μ g/ml Nalidixinsäure angereicherten LB-Platten bei 27 °C kultiviert, wohingegen *E. coli* HB 101 bzw. *E. coli* HB 101 inv⁺ auf Blutagarplatten ohne bzw. mit 100 μ g/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C kultiviert wurden. Am Tag vor dem Experiment erntete man die Bakterien mit einer Impföse von der Platte, resuspendierte sie in 5 ml LB-Medium und inkubierte sie erneut bis zum nächsten Morgen. Danach wurden die Kulturen auf 1:10 verdünnt und für weitere 2 h im Brutschrank aufbewahrt. Den *Yersinia*-Kulturen wurde dabei Nalidixin in einer Konzentration von 100 μ g/ml und den *Escherichia*-Kulturen Ampicillin in derselben Konzentration zugesetzt. Um die Invasinexpression zu induzieren, gab

man zu *E. coli* HB 101 inv⁺ 30 min vor dem Experiment IPTG (1 µl/ml). Nach Zentrifugation und dreimaligem Waschvorgang mit PBS resuspendierte man die Bakterien in PBS. Die Bakterienzahl wurde durch Messung der optischen Dichte dieser Suspension bestimmt. Hier entsprach eine OD_{600nm} von 1,0 einer Konzentration von ca. 5×10^8 Bakterien pro ml. Die MOI (*multiplicity of infection*) der *Y. enterocolitica* wurde auf 20, die der *E. coli* Stämme auf 100 eingestellt und separat durch zusätzliches seriell Ausplattieren überprüft.

Legionella pneumophila ATCC 33216 wurden 4 Tage vor dem Versuch auf einer *Legionella*-B.C.Y.E. α-Agarplatte bei 37 °C angezüchtet und für das Experiment mit PBS geerntet. Das Verfahren zur Bestimmung der Bakterienkonzentration glich dem der anderen Bakterien, wobei die MOI hier 100 betrug.

Die Anzucht von *Listeria monocytogenes* erfolgte in *brain-heart infusion* Medium. Für ein Infektionsexperiment wurden sie analog zu den anderen Bakterien behandelt und anschließend in Infektionsmedium resuspendiert.

2.2.2 Herstellung hitzegetöteter Bakterien

Die Bakterien wurden mit PBS gewaschen und für 40 min bei 60 °C inkubiert. Danach zentrifugierte man die Bakterien (3800 g, RT, 10 min) und resuspendierte sie anschließend in frisches Medium. Die Konzentration wurde wie erforderlich eingestellt. Durch zusätzliches Ausplattieren konnte nach ca. drei Wochen festgestellt werden, ob die Bakterien tatsächlich abgetötet wurden.

2.3 Methoden - Zellkultur

2.3.1 Kultivierung von HeLa 229-Zellen

Die humane Epithelzelllinie HeLa 229 stammt von einem stark proliferierenden Zervix-Karzinom ab und wurde speziell für experimentelle Zwecke kultiviert. Alle Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Die Materialien und Lösungen wurden steril vom Hersteller bezogen. Die Zellen wurden in 175 cm² (80 ml) Gewebekulturflaschen kultiviert. Eine Übersicht über alle in der Zellkultur verwendeten Medien gibt Tab. 8. Da die

Zellen am Flaschenboden adhären, bildete sich nach ca. einer Woche ein konfluenter *Monolayer*. Dreimal wöchentlich wusch man die Zellen und erneuerte das Medium. War der Flaschenboden bis zu 90 % mit konfluenten Zellen bedeckt, wurden sie mit 5 ml Trypsin/EDTA gewaschen und durch Inkubation mit weiteren 5 ml Trypsin/EDTA für 3 min bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Durch Zugabe von 13 ml des normalen Zellmediums wurde das Trypsin inaktiviert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:10 oder 1:5 auf neue Flaschen verteilt, wobei das Gesamtvolumen auf 20 ml mit Medium aufgefüllt wurde.

2.3.2 Kultivierung von EA.hy 926-Zellen

EA.hy 926-Zellen sind EZ, die durch Fusion von HUVE- und A549-Zellen entstanden sind [Edgell *et al.*, 1983]. Abgesehen von den verwendeten Zellkulturmedien glich die Anzucht der EA.hy 926 derer von HeLa 229-Zellen (Tab. 8). Nach Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA, wurden die Zellen mit Medium gewaschen und nach dem Auszählen je nach Bedarf in neuem Medium ausgesät.

2.3.3 Kultivierung von Mono Mac 6-Zellen

Mono Mac 6-Zellen sind nicht-adhärenente monozytäre Zellen und wurden in der Konzentration von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml in entsprechendem Medium ausgesät (Tab. 8). Dreimal pro Woche wurden sie abzentrifugiert, in PBS gewaschen und nach Bestimmung der Zellzahl je nach Bedarf wieder neu ausgesät.

2.3.4 Kultivierung von HUVE-Zellen

Hierbei handelt es sich um aus der Nabelschnurvene isolierte, angezüchtete adhärenente humane Endothelzellen. Sie lagern sich bevorzugt an kollagenisierten Flächen, weshalb vor dem Aussäen zunächst eine Kollagenisierung der Flaschenböden erfolgte. Dieses „*coating*“ der Zellkulturgefäße wurde durch Zugabe von verdünntem Kollagen (12,5 ml Kollagen/500 ml PBS), das den Gefäßboden vollständig bedeckte, über Nacht erreicht. Nach Absaugen des Kollagens wurden diese Gefäße bis zum Experiment im Kühlschrank gelagert.

Die Zellen wurden aufgetaut und in den vorbereiteten Flaschen mit 15 ml Medium kultiviert (Tab. 8). Dreimal pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel. Nachdem sich ein konfluenter *Monolayer* gebildet hatte, wurden die Zellen kurz mit 5 ml Trypsin/EDTA gewaschen und danach durch Inkubation mit 5 ml desselben für 1-5 min bei 37 °C unter mikroskopischer Kontrolle abgelöst. Durch die Zugabe von 8 ml Medium erfolgte schließlich die Inaktivierung des Trypsins. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:10 oder 1:5 auf neue Flaschen verteilt. Die HUVE-Zellen wurden nur bis Passage 6 nach dem Wiederauftauen verwendet.

2.3.5 Infektion von Zellen mit Bakterien

Je nachdem, ob man adhärenente oder nicht-adhärenente Zellen für das Experiment verwendete, wurden die Zellen einen Tag zuvor (adhärenente Zellen) oder am gleichen Tag ausgesät (nicht-adhärenente Zellen). Mit Hilfe der Trypan-Blau-Färbung konnte die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und anschließend durch Verdünnung eingestellt werden. Je nach Experiment und Zelltyp wurden in 6-well-Platten $1-3 \times 10^6$ Zellen, in 24-well-Platten $2,5 \times 10^5$ Mono Mac 6-Zellen bzw. 1×10^5 adhärenente Zellen und in 96-well-Platten 5×10^4 Mono Mac 6-Zellen bzw. 2×10^4 adhärenente Zellen ausgesät. Zwei Stunden vor der Infektion saugte man das Medium ab, das FCS und Antibiotika enthielt und ersetzte es durch ein glutaminhaltiges, FCS- und antibiotikafreies Medium. Auf FCS wurde verzichtet, da es eine unspezifische VEGF-Induktion auslösen kann. *B. henselae* und die anderen verwendeten Bakterien wurden ebenfalls gewaschen, abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 6000 rpm) und in FCS- und antibiotikafreiem Medium aufgenommen. Nach Einstellung der MOI (Bakterienzahl pro Zelle) konnten die Zellen infiziert werden. Je nach Experiment, eingesetzten Bakterien und zu untersuchendem Zelltyp wurden verschiedene MOI (20, 100, 250 oder 500 Bakterien pro Zelle) verwendet. Zur Verbesserung des Bakterien-Zell-Kontaktes wurden die Zellkulturflaschen oder -platten anschließend zentrifugiert (5 min, RT, 1500 rpm). Uninfizierte Zellen mit reinem Medium dienten in den Experimenten als Negativkontrolle und mit PMA (25 ng/ml) behandelte Zellen als Positivkontrolle.

2.4 Methoden - ELISA

Für die Bestimmung der Zytokinkonzentration wurden ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assay*) verwendet. Diese sind durch die hohe Sensitivität besonders dafür geeignet, Zytokine (z.B. VEGF und IL-8) im Zellkulturüberstand quantitativ nachzuweisen. Sie basieren auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei das zu messende Zytokin als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper (*capture antibody*) reagiert, der in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte haftet. Ein weiterer, enzymgekoppelter Sekundärantikörper (*detection antibody*), der ebenfalls an das Zytokin bindet, wird hinzugegeben und so die Farbreaktion katalysiert. Deren Intensität ist proportional zur Zytokin-konzentration, die dann entsprechend photometrisch bestimmt werden kann.

2.4.1 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Die Erfassung der Zytokinsekretion aus Zellkulturüberständen nach bakterieller Stimulation von Hela 229-, HUVE-, Mono Mac 6- und EA.hy 926-Zellen wurde mittels ELISA realisiert. Die Zellen wurden in 24-*well*-Platten ausgesät und nach einer bestimmten Infektionszeit von jedem *well* 1 ml des Zellkulturüberstandes abgenommen. Nach der Zentrifugation (10 min, 4 °C, 21000 g), durch die störende Partikel und nicht-adhärenente Zellen beseitigt wurden, erfolgte die Lagerung der Proben bis zu weiteren Untersuchungen bei -20 °C.

2.4.2 Bestimmung der VEGF-Produktion mittels ELISA

Zum quantitativen Nachweis von VEGF im Überstand wurde eine 96-*well*-Platte mit murinen monoklonalen Antikörpern beschichtet (100 µl/*well*) und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wusch man die Platte und gab *Reagent Diluent* für eine Stunde in die einzelnen *wells*. Diese Blockierung wurde durch einen Waschschrift beendet und die ELISA-Platte bei 4 °C weiter aufbewahrt.

Bei einem ELISA kamen je 100 µl der Proben zum Einsatz. Diese wurden 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit einem Waschpuffer gewaschen. Außerdem wurde eine Standardkurve - eine Verdünnungsreihe aus 100 µl des Standards - mitgeführt. Zu jeder Probe gab man

100 µl Sekundärantikörper (*detection antibody*), der an das Zytokin anlagerte. Nach 2 h wurden die Proben wieder gewaschen und mit 100 µl der auf 1:200 verdünnten Streptavidin-*horseradish-peroxidase* (HRP) bei RT inkubiert, wobei die Reaktion nach 20 min durch erneutes Waschen beendet wurde. Schließlich fügte man 100 µl des Substrates hinzu und bewahrte die Platte 20 min bei RT unter Abwesenheit von Licht auf. Die ablaufende Farbreaktion konnte durch die Zugabe von 50 µl Stopplösung beendet und deren Intensität, photometrisch mit der Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge: 570 nm) bestimmt werden.

2.4.3 Bestimmung der IL-8-Produktion mittels ELISA

Die ELISA-Platte wurde über Nacht bei 4 °C mit 50 µl des monoklonalen Primärantikörpers (3 µg/ml in 0,1 M Na₂HPO₄; pH=9), beschichtet und der Überschuss durch viermaliges Waschen mit PBS/*Tween* entfernt. Danach blockierte man unspezifische Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation mit einem Blockierungspuffer. Nach dem Waschen konnten je 100 µl/*well* Proben und für die Standardkurve rekombinantes humanes IL-8 verdünnt in den Konzentrationen von 0-800 pg/ml auf die ELISA-Platte gegeben werden. Während der anschließenden Inkubation über Nacht bei 4 °C konnte das IL-8 der Proben mit dem Antikörper auf der Platte reagieren. Am nächsten Tag gab man nach vier Waschvorgängen 100 µl des Sekundärantikörpers (0,5 µg/ml) für eine Stunde zu den einzelnen Proben. Man wusch dann die Platte erneut, fügte jeweils 50 µl Konjugat hinzu und inkubierte die Platte eine Stunde bei 37 °C. In der Zwischenzeit löste man PNPP (P-Nitrophenyl-Phosphat) in Substratpuffer bis auf eine Konzentration von 1 mg/ml und gab davon nach dem Waschschritt 50 µl in jedes *well*. Nach 20 min konnte aufgrund der resultierenden Farbreaktion mit Hilfe des Photometers die Zytokinkonzentration bei 405 nm gemessen werden. Die Referenzwellenlänge betrug 490 nm.

2.5 Methoden - Apoptoseinhibition in MM6 durch *B. henselae*

Zur Apoptoseinduktion der Wirtszellen wurde Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels DNA-*Laddering* und MTS-Assay [Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1993; Della Ragione *et al.*, 2000].

2.5.1 Bestimmung der Zellviabilität - MTS-Assay

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der *Cell Titer 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* von Promega verwendet. Mit dieser Methode, die darauf beruht, dass viable, metabolisch aktive Zellen Dehydrogenasen besitzen, kann die Zahl der lebenden Zellen photometrisch gemessen werden. Sie basiert darauf, dass MTS [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-Tetrazolium; *inner salt*] in Anwesenheit eines elektronenbindenden Stoffes, wie PMS (Phenazin-Methosulfat), durch Dehydrogenasen von viablen Zellen in ein Formazan-Produkt reduziert wird. Die Absorption des Formazans liegt bei 490 nm. So kann photometrisch indirekt bestimmt werden, wie hoch die Zellviabilität in einer Zellkultur ist.

Der Versuch wurde in einer 96-*well*-Platte durchgeführt und Zellen - wie in 2.3.5 beschrieben - ausgesät, infiziert und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für jede Versuchsgruppe diente ein *well* mit den gleichen Komponenten aber ohne Zellen als Leerwert. PMS und MTS wurden nach Herstellerangaben 1:20 gemischt und später im Verhältnis 1:6 in die *wells* hinzugefügt. Daraufhin inkubierte man die Platte nochmals 90 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Die Farbintensität wurde photometrisch bei 490 nm gemessen, wobei nach dem Abziehen der jeweiligen Leerwerte von den Versuchsgruppen und der Bestimmung der Mittelwerte die Auswertung erfolgte. Die Viabilität der Negativkontrolle wurde hier als 100 %-Wert definiert und die Versuchsgruppen in Relation dazu gesetzt.

2.5.2 DNA-Laddering

Apoptose führt in Zellen zu bestimmten morphologischen und biochemischen Veränderungen, wie z.B. zum DNA-Abbau in spezifische Fragmente. Diese können mit Hilfe der Gelelektrophorese als „DNA-Leiter“ dargestellt werden. Hierfür wurde das *Apoptotic DNA Ladder Kit* von Roche verwendet.

Ziel war es zu prüfen, ob *B. henselae* die in Mono Mac 6-Zellen ausgelöste Apoptose beeinflusst. Es wurden pro Gruppe 2x10⁶ Zellen/*well* in eine 6-*well* Platte ausgesät und mit *B. henselae*, PDTC oder *B. henselae* und PDTC infiziert bzw. behandelt. Nicht-infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die

MOI lag bei 100 Bakterien pro Zelle und die Konzentration von PDTC betrug 200 μM . Da bakterielle DNA das Bild der extrahierten Gesamt-DNA in der Gelelektrophorese beeinflussen könnte, wurde ebenfalls eine Kontrollgruppe mit *B. henselae* mitgeführt. Nach Herstellerangaben isolierte man die DNA nach einer Infektionsdauer von 24 Stunden. Bei Verwendung eines neuen Kits gab man 80 ml Ethanol zum Waschpuffer. Der Elutionspuffer wurde auf 70 °C und die Reagenzien auf 15-20 °C erwärmt. Außerdem wurden eine 0,5 M EDTA-Lösung, der TBE-Puffer und der Lade-Puffer hergestellt sowie ein 1 %-iges Agarose Gel vorbereitet (Tab. 13, 15). Im Kit war eine Positivkontrolle (Zellen mit charakteristischer apoptotischer DNA) vorhanden. Tab. 14 beschreibt den Vorgang der DNA-Isolation. Die DNA konnte bei -20 °C bis zu 14 Tage eingefroren oder sofort mit einer Gelelektrophorese evaluiert werden (Tab. 16).

Tab. 13: Puffer-Lösungen für DNA-Laddering

EDTA-Lsg. (0,5 M)	18,6 ml EDTA werden in 80 ml Aqua _{bidest} unter Einstellung des pH mit 1 M NaOH auf pH 8,0 +/- 0,1 gelöst und anschließend mit Aqua _{bidest} auf 100 ml aufgefüllt
TBE-Puffer	5,4 g Tris und 2,8 g Borsäure werden in 800 ml Aqua _{bidest} aufgelöst, 2 ml 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0 +/- 0,1) hinzugefügt und anschließend mit Wasser auf 1 l aufgefüllt
Lade-Puffer	0,1 g Natriumdodecylsulfat und 25 mg Bromphenolblau werden in 7 ml Aqua _{bidest} gelöst und 3 ml Glycerin hinzugefügt

Tab. 14: Durchführung des DNA-Laddering

Schritt 1:	Proben in Falcons umpipettieren, Zentrifugieren mit 1500 U, RT, 5 min
Schritt 2:	Überstand absaugen, in 200 μl PBS resuspendieren
Schritt 3:	200 μl Bindepuffer (im Kit enthalten) zufügen, mischen, 10 min bei RT inkubieren
Schritt 4:	Positivkontrolle in 400 μl Lysispuffer (beides im Kit vorhanden) lösen, mischen, 10 min bei RT inkubieren
Schritt 5:	Proben und Positivkontrolle 100 μl Isopropanol zufügen, vortexen
Schritt 6:	Filterröhrchen in Sammelröhrchen stecken, Proben hineinpipettieren und 1 min bei 8000 U zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
Schritt 7:	500 μl Waschpuffer zugeben, 1 min 8000 U zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
Schritt 8:	500 μl Waschpuffer (im Kit vorhanden) zugeben, 1 min bei 8000 U zentrifugieren, dann 10 s bei max. U (13000 U)
Schritt 9:	Sammelröhrchen verwerfen, Filterröhrchen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß setzen
Schritt 10:	200 μl des warmen Elutionspuffers zugeben, 1 min bei 8000 U zentrifugieren

Tab. 15: Herstellung eines 1 %-igen Agarose-Gels

Schritt 1:	1 g Agarose mit 100 ml TBE-Puffer mischen und bis zum Sieden erhitzen
Schritt 2:	Auf 60 °C abkühlen, 5 μl Ethidiumbromid-Stammlösung hinzufügen
Schritt 3:	Lösung in eine Kammer gießen und einen Probenkamm einsetzen
Schritt 4:	Nach dem Erhärten das Gel entnehmen und den Kamm vorsichtig herausziehen

Tab. 16: Durchführung der DNA Gel-Elektrophorese

Schritt 1:	1 (bzw.3) µg der DNA und 15 µl der Positivkontrolle mit Ladepuffer mischen
Schritt 2:	DNA-Molekulargewicht-Marker mit Ladepuffer mischen
Schritt 3:	TBE-Puffer in die Apparatur geben, bis das Gel bedeckt ist
Schritt 4:	Proben in Taschen pipettieren, Elektrophorese über 1,5 h mit 75 V; beenden, wenn Bromphenolblau bis zum Ende der Plattform gewandert ist
Schritt 5:	Gel unter UV-Lampe abfotografieren und dokumentieren

2.6 Methoden - Zytotoxizitätstest

In eine 24-*well* Platte, die mit *Coverslips* bestückt wurde, erfolgte am Tag vor dem Experiment das Aussäen der Zellen mit 1×10^5 HeLa 229-Zellen pro *well*, damit die Zellen über Nacht auf den *Coverslips* adhärten. Am nächsten Tag wurden sie mit FCS- und antibiotikafreiem Medium gewaschen und mit 1 ml desselben für 2 h inkubiert. Für die Infektion wurden viable und hitzegetötete *B. henselae* Marseille, *Y. enterocolitica* pYV⁻ (WAC), *Y. enterocolitica* pYV⁺ (WAP), *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv⁺, *L. pneumophila* ATCC 33216 sowie *L. monocytogenes* verwendet, die man zwischenzeitlich vorbereitet hatte. Die Zellen wurden schließlich mit Bakterien in der gewünschten MOI infiziert. Um die weitere Vermehrung der Bakterien zu verhindern, wurde nach jeweils 1, 6 oder 12 Stunden Gentamicin (100 µg/ml) zu den Proben gegeben. Nach einer 12-, 24- oder 48-stündigen Infektion bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit sammelte man die Überstände und bewahrte sie für das ELISA auf. Die *Coverslips* wurden mit PBS gewaschen und bei RT getrocknet. Zum Fixieren der Zellen auf den *Coverslips* wurden 500 µl von -20 °C kaltem Methanol für 5 min in die *wells* gegeben, anschließend abgesaugt und die Platte wiederum bei RT getrocknet. Zur Färbung der Zellen gab man in jedes *well* 500 µl einer zuvor im Verhältnis 1:10 mit H₂O verdünnten GIEMSA-Lösung. Nach 35 min wusch man die *Coverslips* mit H₂O. Daraufhin erfolgte durch eine dreiminütige Zugabe von 2 ml H₂O/*well* die Zelldifferenzierung, wodurch die überschüssige Farbe ausgewaschen werden konnte. Die Intensität der Färbung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und kontrolliert. Zuletzt wurden die *Coverslips* für 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, mit *Fluorprep* auf einen Objektträger gebracht und dieser mit Entellan versiegelt. Im Anschluss daran erfolgte die Dokumentation unter dem Mikroskop.

2.7 Methoden - RNA

Um einen Einblick in die zellulären Regulationsmechanismen auf mRNA-Ebene nach Infektion mit *B. henselae* zu erhalten, wurde die Konzentration der mRNA-Transkripte in diversen Zelllinien zu bestimmten Zeitpunkten gemessen. Dies gelang bei gezielter Fragestellung nach bestimmten Zytokinen mittels der reversen Transkription und einer Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), die selbst bei nur geringen Mengen an Untersuchungsmaterial genaue Aussagen ermöglichen. Um eine Gesamtaussage über die Signaltransduktion infizierter Zellen machen zu können, wurden Genarrays verwendet, die ebenfalls eine vorherige Isolierung der *messenger*-RNA (mRNA) notwendig machten.

Die mRNA entsteht im Rahmen der Transkription als Kopie von zuvor im Zellkern stimulierten Genen. Der RNA-Strang ist komplementär zur Codon-Sequenz der DNA und wird nach Prozessen wie dem „*Splicing*“ und „*Capping*“ vom Zellkern in das Zytosol zu den Ribosomen transportiert, wobei er als Vorlage für die Proteinbiosynthese - die Translation - dient. Dann werden die eigentlichen Proteinprodukte entsprechend der Anzahl der mRNA-Moleküle gebildet. Mittels der RT-PCR kann nun die gebildete mRNA eines Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten einer Infektion quantitativ erfasst und so auf Transkriptionsebene der Zellzustand bestimmt werden. *Microarrays* ermöglichen darüber hinaus die Quantifizierung des gesamten Aktivierungsgrades einer Zelle. Die zelluläre mRNA dient als Matrize und wird in komplementäre DNA umgeschrieben, wobei in einem *Microarray* prinzipiell alle synthetisierten mRNA-Moleküle erfasst werden können.

Nach entsprechender Infektionsdauer isoliert man also die mRNA und wandelt diese mit Hilfe der reversen Transkription in cDNA um. Durch Amplifizierung der cDNA mittels PCR und Durchführung einer Gelelektrophorese kann eine qualitative Aussage über die Menge der cDNA und über den Aktivierungszustand der Zelle getroffen werden. In einer *real-time*-PCR am *LightCycler* System erfolgte zudem eine quantitative Messung. Zusätzlich wurde die mRNA für die spätere Durchführung von Genarray-Analysen in *double-stranded* (ds) cDNA umgewandelt. Die einzelnen Arbeitsschritte werden im Folgenden erläutert.

2.7.1 RNA-Extraktion aus Wirtszellen

Da nur eine begrenzte Anzahl von Zellen im Experiment zum Einsatz kam, benutze man für die RNA-Extraktion das *Rneasy-Kit* von Quiagen, wobei man sich an den Angaben des Herstellers orientierte. Die Zellen wurden mit der angegebenen Menge Lysispuffer lysiert und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette homogenisiert. Um die Bindungseigenschaften der RNA zu erhöhen, fügte man das gleiche Volumen von kaltem 70 %-igen Ethanol hinzu. Dieses Gemisch wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben, das eine Silikagelmembran enthielt, an welche die RNA binden konnte. Durch Zentrifugieren (13000 rpm) und verschiedene Waschschriffe mit mitgelieferten Pufferlösungen, wurde die RNA von Verunreinigungen befreit und schließlich mit 2x30 µl RNase-freiem H₂O eluiert. Die gewonnene RNA konnte bei -80 °C einige Zeit gelagert werden. Bei der Arbeit mit RNA war zu beachten, dass diese sehr instabil ist und von den ubiquitär vorhandenen RNasen schnell abgebaut wird. Daher musste mit besonderer Sorgfalt und schnell gearbeitet werden. Um den Abbau der RNA einzudämmen, wurden alle Schritte auf Eis, mit frischen Verbrauchsmaterialien und sterilen Plastikeinwegmaterialien durchgeführt. Des Weiteren verwendete man *RNAse-Away* zur Reinigung von Arbeitsflächen und benutzte mit Diethyl-Pyrocbonat (DEPC) behandeltes Wasser (H₂O-DEPC).

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch bei 260 nm. Der Null-Wert wurde mit TRIS-Cl Puffer (pH=7,5) kalibriert. Nachfolgend wurden die einzelnen RNA-Proben auf 1:100 mit dem TRIS-Cl-Puffer verdünnt und gemessen, wobei RNA mit einer optischen Dichte von 1,0 eine Konzentration von 40 µg/ml besitzt [Sambrook *et al.*, 1989]. Über das Verhältnis der Absorptionwerte bei 260 nm und 280 nm (*absorbance ratio*) konnte zudem eine Aussage über die Reinheit der RNA gemacht werden, wobei bei dem verwendeten TRIS-Cl-Puffer (pH=7,5) ein Wert zwischen 1,9 und 2,1 für einen optimalen RNA-Zustand spricht [Delidow *et al.*, 1993]. Zusätzlich wurde die RNA in einer horizontalen Gelelektrophorese aufgetrennt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff unter UV-Licht sichtbar gemacht. Mit Hilfe der eindeutigen Darstellung von spezifischen Banden der rRNA bei 1,9 bp (18S) und 5 bp (28S) konnte somit gezeigt werden, dass die RNA weitestgehend intakt war.

Für die Elektrophorese wurden 250 ml 20xTAE-Puffer und der Probepuffer hergestellt (Tab. 17). Die RNA-Proben (1 µg RNA in 5 µl H₂O-DEPC) wurden mit 5 µl Probepuffer denaturiert. Dieses RNA-Probepuffer-Gemisch wurde auf 65 °C erhitzt und zuletzt in das 1,2 %-ige Agarosegel aufgebracht. Die Elektrophorese wurde bei 60 V durchgeführt. Die Färbung des Gels erfolgte für ca. 25 min in einer RNase-freien Ethidiumbromid-Lösung. Für die anschließende Geldokumentation diente die Software „Quantity One“.

Tab. 17: RNA Gel-Elektrophorese

TAE-Puffer:	0,8 M TRIS, 5,5 ml Essigsäure, 20 mM EDTA
Probepuffer:	0,2 ml 20xTAE, 0,3 ml Formaldehyd, 0,82 ml Glycerol, 2 mg Bromphenolblau, 0,68 ml Formamid
Agarosegel:	1,2 g Agarose in 100 ml 1xTAE-Puffer erhitzen

2.7.2 Reverse Transkription

Die mRNA besitzt eine Polyadenylierung des 3'-Endes (Poly-A-Sequenz) und wird zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase in die einzelsträngige cDNA (*complementary* oder *copy* DNA) umgeschrieben [Kawasaki, 1989]. Dafür wurde zu 5 µg mRNA insgesamt 1 µl Oligo-dt (Thymidin-Basen) gegeben und das Volumen mit H₂O-DEPC auf 10 µl aufgefüllt. Bei 65 °C fand über 10 min das *Primer-Annealing* statt, wobei die Thymidin-Basen komplementär an die Poly-A-Enden hybridisieren, was für das spätere Ansetzen der reversen Transkriptase notwendig ist. Die Tab. 18 und Tab. 19 zeigen die Einzelschritte dieser Methode. Die erhaltene cDNA wurde zuletzt 1:10 mit H₂O-DEPC verdünnt (+180 µl H₂O-DEPC) und diente der darauffolgenden PCR als Matrize.

Tab. 18: Durchführung der reversen Transkription

Schritt 1:	Bereitstellung der Reagenzien pro Probe, insgesamt 10 µl (siehe Tab.19)
Schritt 2:	Zugabe zur vorbereiteten mRNA (10 µl) und Inkubation für 60 min bei 42 °C
Schritt 3:	Inaktivierung: Inkubation für 5 min bei 90 °C

Tab. 19: Übersicht über die für die reverse Transkription benötigte Reagenzien

4,0 µl	RT-5x Puffer	
1,0 µl	RNAsin	(entspricht 40 units)
2,0 µl	DTT 0,1 M	
2,0 µl	Nukleotid-Mix	(entspricht je 200 mM Endkonzentration von dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
1,0 µl	Rev. Transkriptase	(entspricht 200 units)

2.7.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht eine qualitative Aussage über die Expression einzelner cDNA-Abschnitte und zählt zu den häufigsten Methoden zur Synthese von DNA-Sequenzen. Hierbei werden spezifische *Primer*-Paare eingesetzt, die selektiv einen cDNA-Abschnitt markieren („*annaeling*“), damit daran später die Polymerase ansetzen kann. Nach der Zugabe von Oligonukleotiden wird ein komplementärer Strang der DNA-Sequenz neusynthetisiert („*Elogantion*“). Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt, so dass es zur exponentiellen Vermehrung des cDNA-Abschnittes kommt. Zur Durchführung einer PCR benötigt man neben 5 µl Proben-cDNA (1 µg/µl) 45 µl des *Master-Mixes* (Tab. 20). Dieses Gemisch wird dann in den *PCR-Cycler* gegeben, wo es je nach verwendetem *Primer* ein bestimmtes Programm durchläuft (Tab. 21).

Tab. 20: Übersicht über die Reagenzien für einen *Master-Mix*

25,1 µl	H ₂ O-DEPC	
5,0 µl	10xTris PCR Puffer (10 mM)	
1,0 µl	MgCl ₂ (25 mM)	(entspricht 2,5 mM Endkonzentration)
1,0 µl	Nukleotid-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	(entspricht je 200 mM Endkonzentration von dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
12,5 µl	<i>Primer-Mix</i>	(entspricht 25 pmol jedes 5' und 3' <i>Primers</i>)
0,4 µl	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase (Taq-Polymerase)	(entspricht 2 units)

Tab. 21: PCR-Temperaturprofile und Anzahl der PCR-Zyklen

	β-Aktin	VEGF	IL- 8
Hot start		94 °C; 300 s	95 °C; 600 s
Denaturierung	94 °C; 60 s	94 °C; 45 s	95 °C; 60 s
<i>Primer Annealing</i>	72 °C; 150 s	60 °C; 60 s 72 °C, 60 s	60 °C; 150 s 72 °C; 300 s
Elongation	22 Zyklen	35 Zyklen	25 Zyklen
Ende	72 °C; 300 s	72 °C; 300 s	-
Pause	4 °C; ∞	4 °C; ∞	4 °C; ∞

Neben den *Primern* für VEGF und IL-8 wurde auch eine PCR für das konstitutiv exprimierte Gen β-Aktin mitgeführt, damit die DNA-Banden (entsprechend die DNA-Menge) später in einer Gelelektrophorese relativiert werden konnten. Waren die β-Aktin-Mengen unterschiedlich stark ausgeprägt, wurde der Versuch wiederholt.

2.7.4 DNA-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der DNA-Gelelektrophorese wurde zum einen überprüft, ob die spezifischen Fragmente entstanden waren und zum anderen konnte eine Aussage über die Menge der gesuchten DNA gemacht werden. Sie basiert darauf, dass sich DNA - aufgrund der negativen Nettoladung - durch Wanderung im elektrischen Feld der Größe nach auftrennen lässt. Bei der Elektrophorese kam ein 1-1,5 %-iges Agarosegel zum Einsatz. Dafür wurde Agarose in 0,5xTAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und in die Gelkammer gegeben. Bevor die Proben auf das Gel gebracht wurden, mischte man 10 µl PCR-Produkt mit 5 µl 10x Probepuffer, der als Marker (*loading buffer*) diente. Als Kontrolle wurden 2 µl einer 1 kb DNA-Leiter mitgeführt. Je nach Größe des Gels wurde es für 30 bis 90 min 120 V ausgesetzt, anschließend 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und weitere 5 min in einem Wasserbad entfärbt. Unter UV-Licht wurde der Fluoreszenzfarbstoff dann sichtbar. Der Vergleich der Bandenstärke erlaubte eine Aussage über die Protein-Expression in der Zelle zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion. Das Gel wurde zuletzt mit einer Geldokumentationsanlage digital aufgenommen und mit der Software „*Quantity One*“ optimiert.

2.7.5 *Real-time*-(RT-) PCR am *LightCycler*

Im Gegensatz zur konventionellen PCR kann man mit der *real-time*-PCR am *LightCycler* System die VEGF- und IL-8-mRNA quantitativ messen, da hier die Menge der neu amplifizierten DNA mittels eines Fluoreszenzmarkers durch photometrische Messung erfasst wird. Beim *Primer Set* (Roche) für IL-8-mRNA und G-6-PDH-mRNA war dies der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I*, der sich an die dsDNA anlagerte. Da sich die neu amplifizierte DNA bei jedem Kopierschritt der PCR erhöhte, erhöhte sich proportional die eingelagerte Farbstoffmenge. Durch Messung der Fluoreszenzstärke wurde so der Reaktionsverlauf mit der *LightCycler* Software 3.1 sichtbar. Bei der VEGF/G6PDH-PCR kamen *TaqMan*-Sonden von TIB Molbiol zum Einsatz, die durch ein zwischen zwei *Primern* gelagertes, fluoreszierendes Oligonukleotid gekennzeichnet sind. Mit der *Taq*-Polymerase konnte dieses Oligonukleotid dann aus den *Primern* gelöst werden. Bei jeder Neusynthese eines Stranges nach einem Zyklus konnte so

eine Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden. Als Kontrollen dienten β 2-Mikroglobulin-mRNA für die VEGF-mRNA und G-6-PDH-mRNA für die IL-8-mRNA. Diese Gene werden in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiert. Außerdem führte man einen Standard mit, der im Fall der IL-8/G6PDH-PCR von Roche erworben wurde. Da die Herstellerangaben über die Kopienzahl, je nach Charge differierten, wurde eine Verdünnungsreihe mitgeführt. Bei der VEGF/ β 2-MG-PCR kam als Standard ein Plasmid zum Einsatz (Wellmann *et al.*, 2001). Mittels der Verdünnungsreihe (10^3 - 10^6 Plasmide/ μ l) wurde so eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe später die tatsächliche Kopienzahl der cDNA berechnet wurde. Allen Schritten gemeinsam war das Arbeiten auf Eis und die Vorbereitung eines *Master-Mixes* sowie eines spezifischen *Primer-Mixes*.

Bei der IL-8/G6PDH PCR gab man 15 μ l des *Master-Mixes* (Tab. 22) in eine *LightCycler*-Kapillare und pipettierte 5 μ l der unverdünnten Proben-cDNA oder des Standards hinzu. Die Proben wurden im Rotor zentrifugiert, schließlich in den *LightCycler* gesetzt und das Programm gestartet (Tab. 23).

Tab. 22: *Master-* und *Primer-Mix* für IL-8/G6PDH

<i>Master-Mix</i> (Roche) = 20 μ l
11 μ l H ₂ O
2 μ l Primer (entsprechend IL-8 oder GPDH <i>LightCycler-Primer Set</i>)
2 μ l <i>Master</i> (10x <i>LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I</i> , nach Herstellerangaben)
5 μ l H ₂ O oder 5 μ l cDNA oder 5 μ l Standard*

* Für den Standard wird in 3 Eppendorfgefäße je 13,5 μ l *Stabilizer* (im Set enthalten) vorgelegt. Aus dem unverdünntem Standard werden nun 1,5 μ l in das Erste gegeben und gut vermischt. Daraus entnimmt man wiederum 1,5 μ l und gibt sie in das nächste Gefäß, usw.. So erhält man Konzentrationen von 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000, die dann die Standardreihe darstellen.

Tab. 23: Bedingungen für die IL-8/GPDH-RT-PCR

1. Denaturierung	95 °C, 10 min
2. <i>Annealing</i>	68 °C; pro Zyklus 0,5 °C weniger bis auf 58 °C, 10 s
3. Amplifikation	72 °C, 16 s
Zyklenzahl	35 Zyklen
4. Schmelzkurve*	von 58 °C auf 95 °C mit 0,1 °C/s Temperaturerhöhung
5. Pause	40 °C, 30 s

* Die Schmelzkurve dient der Unterscheidung zwischen Artefakt und PCR-Produkt und wurde am Ende jeder PCR durchgeführt. Durch die erneute Denaturierung kam es zur Auftrennung der dsDNA, entsprechend ihres Schmelzpunktes. Da der Farbstoff in die dsDNA eingelagert war, sank mit steigender Anzahl an Einzelsträngen auch die Fluoreszenzstärke. Die Schmelzpunkte der Artefakte liegen dabei unterhalb der von den PCR-Produkten.

Für die VEGF/ β 2-MG-PCR pipettierte man jeweils 17 μ l des *Primer-Mixes* für die Proben und für den Standard in die Kapillaren (Tab. 24). Die cDNA wurde 1:8 mit Aqua_{bidest.} verdünnt und davon 3 μ l zum vorgelegten *Primer-Mix* gegeben. Von der verdünnten Standardreihe fügte man 3 μ l zu dem *Primer-Mix* hinzu, zentrifugierte die Proben und startete das Programm (Tab. 25). Als Leerwert diente 3 μ l Aqua_{dest.}. Indem man die Messwerte aus den Doppelbestimmungen mit der Kopienzahl in Relation setzte, wurde die Anzahl der PCR-Produkte bei der IL-8/G6PDH-RT-PCR berechnet. Für die Quantifizierung der amplifizierten Kopien der VEGF/ β 2-Mikroglobulin-RT-PCR-Produkte verwendete man die Formel: $\text{Kopienzahl VEGF} \times 1000 / \text{Kopienzahl } \beta 2\text{-Mikroglobulin}$.

Tab. 24: Master- und Primer-Mix für VEGF/ β 2-Mikroglobulin

Master-Mix	VEGF-Primer-Mix	β 2-MG-Primer-Mix	Standard
7,8 μ l H ₂ O	15,25 μ l Master-Mix	15,25 μ l Master-Mix	15,25 μ l Master-Mix
3,0 μ l MgCl ₂ (50 mM)	0,7 μ l VEGF ex3for	0,7 μ l B2M F	0,7 μ l VEGF ex3for
2,0 μ l 10xPuffer	0,7 μ l VEGF ex8r	0,7 μ l B2M R	0,7 μ l VEGF ex7ex5r
2,0 μ l dNTP (2 mM)	0,4 μ l TM VEGFex3	0,4 μ l B2M TaqMan	0,4 μ l TM VEGFex3
0,3 μ l BSA (10 μ g/ μ l)	3 μ l cDNA (1:8 mit Aqua dest. verdünnt)	3 μ l cDNA (1:8 mit Aqua dest. verdünnt)	3 μ l Plasmid
0,15 μ l PlatinumTaq (5 U/ μ l)			
= 15,25 μ l	= 20 μ l	= 20 μ l	= 20 μ l

Tab. 25: Bedingungen für die VEGF/ β 2-Mikroglobulin RT-PCR

1. <i>Hot start</i> (Initiale Denaturierung)	95 °C, 2 min
2. Denaturierung	95 °C, 8 s
3. <i>Primer Annealing</i>	68 °C, 12 s
4. Extension	72 °C, 20 s
Zyklenzahl	40 Zyklen
5. Pause	35 °C, 120 s

2.8 Methoden - Gen-Microarrays

Der Zellstoffwechsel wird durch das Zusammenspiel vieler Gene reguliert. Ein *Gen-Microarray*, dessen Prinzip auf komplementärer Basenpaarung von Nukleotidsequenzen beruht, ermöglicht einen definierten Genpool zu untersuchen und somit auch komplexe Regulationsmechanismen aufzudecken. Hierbei liefern molekularbiologische Methoden wie die PCR, das Umschreiben von RNA zu DNA, das Markieren von spezifischen Nukleotiden (radioaktiv oder fluoreszierend) und die konfokale Lasermikroskopie die Grundlagen.

2.8.1 *Microarray*-Arten

Microarrays kann man je nach Verwendung in zwei große Gruppen, die cDNA- und die Oligonukleotid-Arrays, einteilen. Erstere dienen der quantitativen Erstellung von Expressionsprofilen, wohingegen Oligonukleotid-Arrays für die qualitative Genotypanalyse genutzt werden. Dabei kennt man diverse Analyseansätze, wie die DNA-, RNA- und Proteinanalysen. Bei DNA-Analysen wird feste Proben-DNA mit zwei DNA-*Targets* (DNA von Experiment und Kontrolle) hybridisiert. So kann man sehr schnell die Expression sehr vieler Gene (*High-throughput Genemapping*) untersuchen. Bei RNA-Analysen werden von der RNA abgeleitete cDNA-Proben verwendet, die mit *Targets* aus zwei fluoreszenzmarkierten revers transkribierten cDNAs hybridisiert wurden. Aus dem Verhältnis der Wellenlängen ergibt sich dann das Genexpressionsmuster. Als Trägersubstanz verwendet man beschichtete Glasscheibchen mit einer Größe von ca. 1,3 cm² oder Nylon/Nitrocellulosemembranen. Darauf befinden sich bis zu 300000 voneinander getrennte Spots, auf denen Tausende von Sondenmolekülen mit bekannter DNA-Sequenz (Proben-DNA) genau angeordnet und fixiert wurden. *Microarrays* für Proteinanalysen bestehen aus Proteinen, die auf ein mit Polyacrylamid beschichtetes Glasplättchen gespottet wurden. Diese interagieren mit anderen Proteinen oder niedermolekularen Substanzen, so dass man z.B. neue Enzymsubstrate untersuchen kann.

2.8.2 Grundlagen der Gen-*Microarray*-Technologie und Durchführung

Für die Genexpressionsanalyse wird ein *Target-Sample* durch Extraktion der mRNA hergestellt. Die aufgereinigten RNA-*Samples* werden durch reverse Transkription mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden in *cDNA-Samples* umgeschrieben und als *Target-DNA* auf den Träger gegeben. Durch Hybridisierung (*Watson-Crick-Base-Pairing*) lagern sich über Wasserstoffbrücken zwei komplementäre Nukleinsäuresegmente (Einzelstränge) selektiv zusammen. Danach wird der Träger gewaschen, damit nur die entsprechend ihrer Komplementarität gebundenen Nukleinsäuren auf dem Spot bleiben. Da die Struktur des vorgelegten Einzelstranges auf dem Array bekannt ist, kennt man auch die des komplementären Stranges und nach erfolgreicher Bindung ändert sich, je nach

Bindungshäufigkeit, die Intensität des Markers. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Scannern oder dem konfokalen *Laser-Scanning-Fluoreszenz*-Mikroskops kann später die Identifizierung und Quantifizierung der *Target*-DNA erfolgen. Da die *Target-Samples* der Kontrolle und der Probe zuvor unterschiedlich markiert wurden, kann durch Vergleich der Absorption festgestellt werden, ob Gene exprimiert oder reprimiert wurden. Das wichtigste statistische Hilfsmittel ist dabei die Clusteranalyse. Es wurden Intensitätsratios größer oder kleiner als 1 gemessen. Die DNA-Spots wurden einzeln vermessen und die relative Häufigkeit der Sequenzen in den *Target-Samples* bestimmt. Ist die Ratio größer als 1, kam es zur Genexpression, ist sie kleiner als 1, liegt eine Genrepression vor. Eine Ratio um 1 weist auf ein stabiles Expressionslevel hin. Das resultierende Genmuster erlaubt nun Aussagen zu den zellulären Regulationsmechanismen.

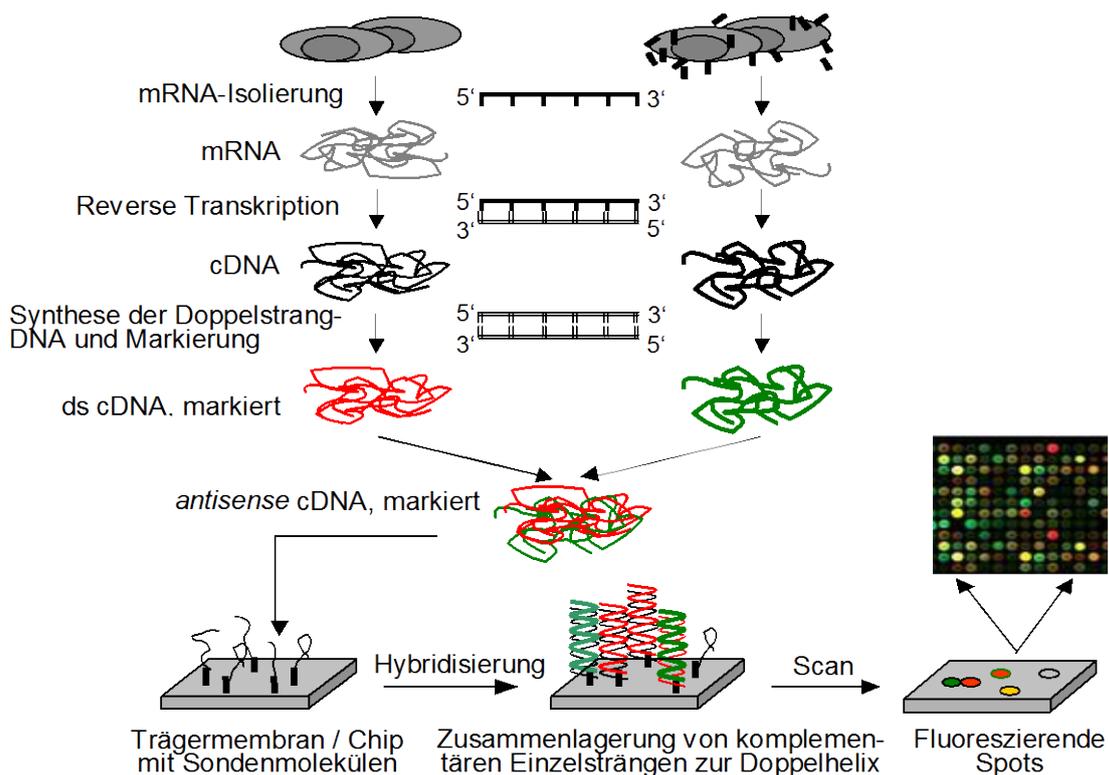


Abb. 6: Vorbereitung und Prinzip des *Microarrays*. Für eine Expressionsanalyse wird die zu untersuchende mRNA extrahiert und mittels reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wird dann mit fluoreszenz-markierten Nucleotiden in markierte ds cDNA-Samples umgeschrieben. Danach werden die Samples mit der Proben-DNA auf dem Array - auf dem bekannte spezifische cDNA-Proben immobilisiert wurden - hybridisiert und gewaschen. Mit Hilfe von konfokalen *Laser-Scanning-Fluoreszenz*mikroskopen oder Fluoreszenz-Scannern können die DNA-Spots einzeln oder parallel vermessen und das Verhältnis (Ratio) und damit die relative Häufigkeit der Sequenzen in den beiden *Target-Samples* bestimmt werden (Abb. des Arrays: www.genome.wellcome.ac.uk).

Da die Arrayfelder sehr klein sind, müssen benachbarte Felder gut voneinander abgegrenzt und die Hintergrundsignalintensität, die z.B. durch ungebundene *Targets* verursacht wird, abgezogen werden. Zudem wurde eine Mittelung durchgeführt, da die Signalintensität pro Spot nicht gleichmäßig verteilt ist. Die Nachbearbeitung erfolgte mit Affymetrix-Standard-Software am PC.

2.8.3 Vorbereitung der Proben und Auswertung des *Microarrays*

Hierfür wurden HeLa 229- und HUVE-Zellen mit *B. henselae* infiziert und die Gesamt-RNA mit dem *Rneasy Mini Kit* (Quiagen) aus je zwei nicht-infizierten und zwei infizierten Zellkulturen extrahiert. Nach Prüfung der RNA-Qualität und RNA-Quantität wurde die zu erwartende VEGF-mRNA- und IL-8-mRNA-Induktion mittels RT-PCR und somit der Infektionserfolg kontrolliert.

Man verwendete die *Microarrays: Human Genome 95Av2* (HeLa 229-Zellen) und U133A (HUVEC). Zuerst wurden 5 µg Proben-RNA - mit dem *SuperScript ds-cDNA Synthese Kits* (Invitrogen) - in ds cRNA umgeschrieben. Die cRNA wurde dann mit dem *Enzo BioArray™ HighYield™ RNA Transcript Labeling Kit* von Affymetrix mit Biotin markiert. Die Hybridisierung, die Färbung, die Waschschriffe und das Scannen erfolgten nach Angaben des Herstellers (Affymetrix, *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual*) bei den Kooperationspartnern (Dr. Alitalo, K., Universität Helsinki, Finnland; Dr. Bonin, M., *Microarray Facility*, Tübingen). Die Nachbearbeitung wurde mit der Software Affymetrix® *Microarray Suite Version 5.0*, Affymetrix MicroDB 3.0 und *Data Mining Tool Version 3.0* durchgeführt.

2.9 Statistik

Alle dargestellten Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und ergaben stets vergleichbare Ergebnisse. Bei der Auswertung wurde jeweils eine Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Bewertung und die Ermittlung des Signifikanzniveaus erfolgten über den Student T-Test. Die Differenz von Werten mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1 Induktion angiogenetischer Gene nach Infektion mit *B. henselae* in verschiedenen Zelllinien

VEGF ist ein starkes Mitogen für EZ, das z.B. auch von Tumorzellen produziert wird [Folkman, 1995]. Das proinflammatorische IL-8 wird ebenfalls von einer Vielzahl von Zellen sezerniert und nimmt neben seiner Funktion als Modulator des Immunsystems auch eine wichtige Rolle in der Angiogenese ein [Strieter *et al.*, 1992]. Da EZ durch eine *B. henselae*-Infektion zur Sekretion von VEGF angeregt werden können, sollte überprüft werden, ob *B. henselae* auch in anderen Zelllinien VEGF und darüber hinaus auch IL-8 induzieren kann [Kempf *et al.*, 2001a]. Hierfür wurden verschiedene Zelllinien, wie HeLa 229-Zellen, HUVE-Zellen, EA.hy 926-Zellen sowie Mono Mac 6-Zellen verwendet.

3.1.1 Induktion von VEGF-mRNA und IL-8-mRNA in HeLa 229-Zellen

Zunächst wurde gezeigt, dass es bei der Infektion von HeLa 229-Zellen mit *B. henselae* zu einer Induktion der VEGF- und IL-8-mRNA kommt (Abb. 7). Um im Anschluss auch das Genexpressionsmuster mittels Gen-Chips erstellen zu können, wurde die Zeitkinetik der VEGF- und IL-8-Induktion erfasst. Darüber hinaus sollte der Zusammenhang zwischen der BadA-Expression des Bakteriums und der VEGF-Induktion in den Zellen untersucht werden. HeLa 229-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250) infiziert und nach 2 h, 6 h und 24 h die mRNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die VEGF-Induktion wurde qualitativ mit Hilfe einer VEGF- und β -Aktin-PCR in einer Gelelektrophorese dokumentiert. Hierbei ergab β -Aktin als interne Kontrolle der RT-PCR ein einheitliches Bandenmuster. Mit den verwendeten *Primern* für VEGF wurden die vier VEGF-Isoformen VEGF_{121, 165, 189, 206} dargestellt. Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass auch in nicht-infizierten HeLa 229-Zellen eine basale Expression von VEGF_{121, 165, 189} vorliegt. Nach der Infektion mit *B. henselae* wurde diese mRNA-Synthese allerdings deutlich verstärkt. Hinzu kommt, dass zusätzlich auch die mRNA von VEGF₂₀₆ induziert wurde.

Bei den HeLa 229-Zellen, die mit dem *B. henselae*-Wildtyp infiziert wurden, zeigte sich so bereits nach 2 h eine stärkere Induktion der VEGF-mDNA gegenüber den nicht-infizierten Zellen. Nach 6 h erkennt man, dass sich die VEGF-Induktion auf alle 4 Isoformen bezieht, wobei VEGF₁₆₅ und VEGF₁₈₉ intensiver induziert wurden. Auch nach 24-stündiger Infektion ist die VEGF-Induktion weiterhin deutlich zu erkennen, wobei nun zusätzlich auch das membranständige VEGF₂₀₆ stärker exprimiert wurde. Man kann also ableiten, dass nach 2 bis 6-stündiger Infektion vermehrt die löslichen VEGF-Isoformen (VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅) und erst später die membranständigen Isoformen (VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆) auf mRNA-Ebene synthetisiert werden.

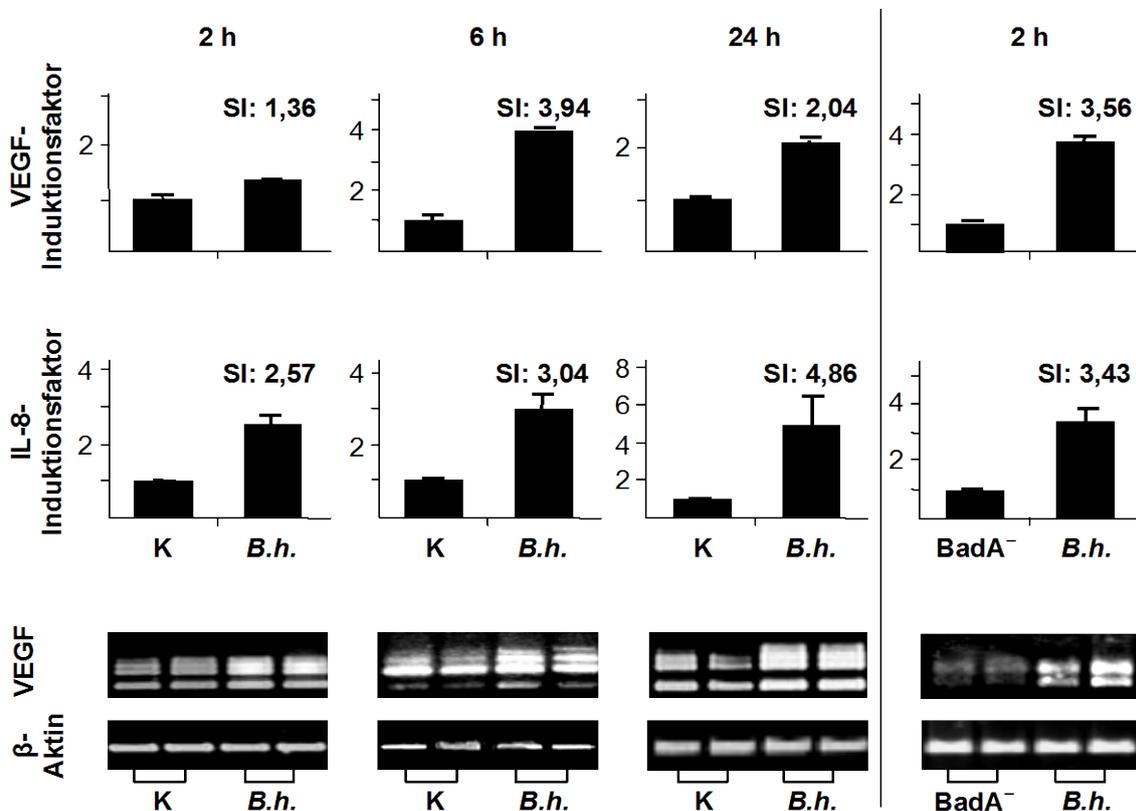


Abb. 7: Geninduktion auf mRNA-Ebene in mit *B. henselae* infizierten HeLa 229-Zellen. Die Analyse der Geninduktion von VEGF und IL-8 erfolgte mittels RT-PCR und quantitativer RT-PCR am *LightCycler*. HeLa 229-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250) bzw. mit *B. henselae* (MOI 500) und *B. henselae* BadA⁻ (MOI 500) infiziert und über 2 h, 6 h und 24 h inkubiert. Es wurden die VEGF-Isotypen VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ dargestellt. Als interne Kontrolle für die konventionelle PCR diente β -Aktin, das gleiche Bandenintensitäten lieferte. Für die quantitative RT-PCR von VEGF bzw. von IL-8 wurden als interne Kontrolle β -2-Mikroglobulin bzw. G-6-PDH verwendet. Als Positivkontrolle dienen PMA-behandelte (25 ng/ml) Zellen. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Proben pro Gruppe dar. K: Kontrolle mit nicht-infizierten HeLa 229-Zellen; B.h.: *B. henselae*-infizierte HeLa 229-Zellen; BadA⁻: *B. henselae* BadA⁻-infizierte HeLa 229-Zellen. SI: Stimulationsindex.

Die VEGF-mRNA wurde auch in einer *real-time*-PCR quantifiziert. Die maximale Induktion der VEGF-mRNA wurde nach 6 h gemessen. Hierbei war die VEGF-mRNA der mit *B. henselae* infizierten Zellen um das 3,9-fache erhöht. Parallel dazu wurde auch die IL-8-mRNA bestimmt. In diesem Fall zeigte sich, dass das Maximum der IL-8-Induktion mit einer 4,9-fachen Induktion im Vergleich zur Negativkontrolle nach 24 h erreicht wurde (Abb. 7).

Da vermutet wird, dass die BadA-Expression von *B. henselae* mit dessen Zytokininduktion in Endothelzellen korreliert, wurden HeLa 229-Zellen nochmals mit *B. henselae* und zusätzlich mit einer BadA-negativen Variante (MOI 500) infiziert. Bereits nach 2 h erkennt man die verminderte Induktion von VEGF (3,6-fach weniger) und von IL-8 (3,4-fach weniger) (Abb. 7). Die Tatsache, dass der Wildtyp zu einer stärkeren Induktion der Zytokine führt, verifiziert die Korrelation zwischen der BadA-Expression und der Zytokininduktion durch *B. henselae*.

3.1.2 Induktion von VEGF-mRNA und IL-8-mRNA in HUVE-Zellen

Als nächstes sollte die VEGF- und IL-8-Induktion von HUVE-Zellen nach Infektion mit *B. henselae* untersucht und die Fähigkeit von *B. henselae* zur VEGF-Induktion, abhängig von ihrer BadA-Expression, geprüft werden. Der Versuch diene ebenfalls als Grundlage für spätere Genarray-Experimente.

Es wurden HUVE-Zellen mit *B. henselae* infiziert und nach 2 h, 6 h und 24 h die mRNA der Zellen isoliert. Nach einer Quantitäts- und Qualitätsprüfung der mRNA wurde diese in cDNA umgewandelt und zunächst eine semi-quantitative Kontrolle der VEGF-Induktion durchgeführt. Nachdem die PCR-Produkte einer β -Aktin-PCR ein einheitliches Bandenmuster ergaben, erfolgte die VEGF-PCR. Wiederum wurden die *Primer* verwendet, die Banden für die VEGF-Isoformen VEGF_{121, 165, 189, 206} lieferten. Die mit dem Wildtyp infizierten HUVE-Zellen zeigten nach 2-stündiger Infektion eine VEGF-Induktion gegenüber der Kontrollgruppe, wobei die Induktion der einzelnen VEGF-Isoformen nicht eindeutig war. Nach 6 h erkennt man eine VEGF-Induktion, die sich vermutlich auf die Isoformen VEGF_{121, 189, 206} beschränkt, wobei VEGF₁₂₁ am stärksten induziert wurde. Nach 24 h bleibt das Bild der VEGF-Induktion weiterhin bestehen, wobei auch hier VEGF₁₂₁ stärker exprimiert wurde (Abb. 8).

Es konnte gezeigt werden, dass HUVE-Zellen auch ohne Stimulation durch *B. henselae* eine basale Expression von VEGF_{121, 189, 206} auf mRNA-Ebene aufweisen. Nach Infektion mit *B. henselae* wurde diese VEGF-mRNA-Synthese verstärkt, wobei VEGF₁₂₁ offenbar einer höheren Induktion unterlag. Die mRNA wurde auch diesmal in einer *real-time-PCR* am *LightCycler* quantifiziert, wobei die maximale VEGF-mRNA-Induktion nach 24 h Infektion vorlag und dem 5,5-fachen der Negativkontrolle entsprach. Auch bei der parallel dazu mitgeführten IL-8-RT-PCR zeigte sich nach 24 h die maximale Induktion (8,3-fache Induktion) gegenüber nicht-infizierten Zellen (Abb. 8).

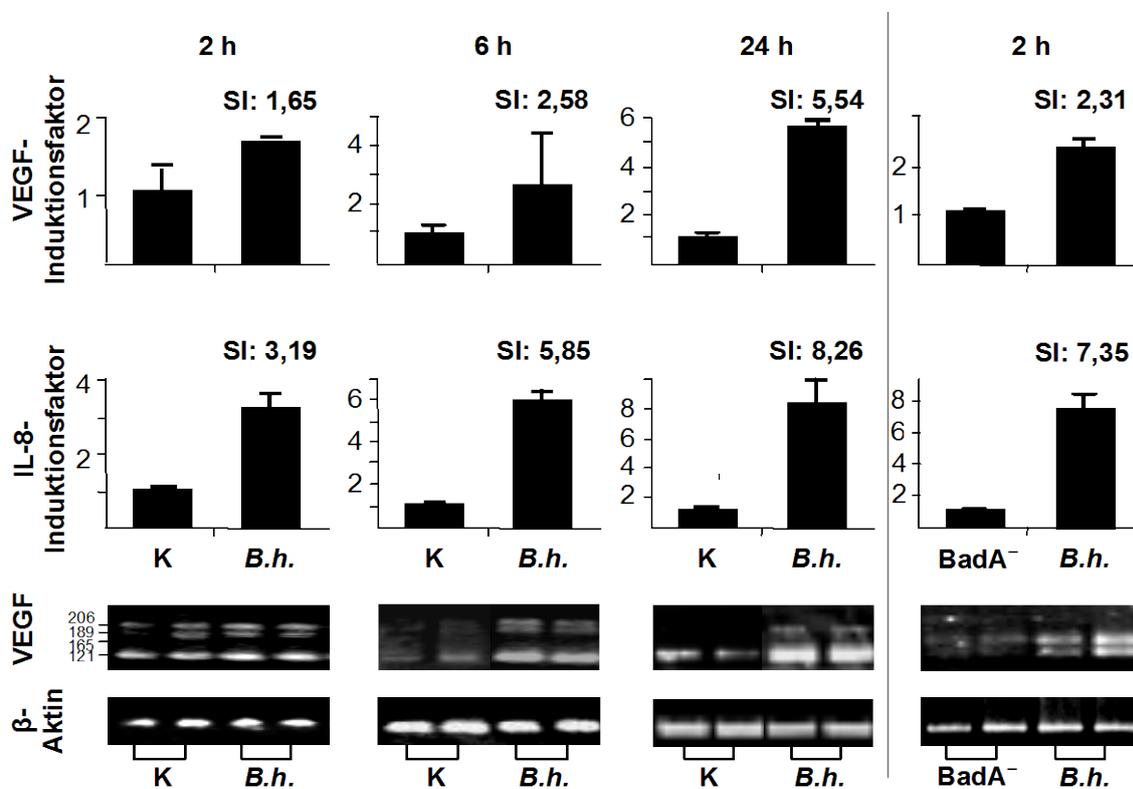


Abb. 8: Geninduktion auf mRNA-Ebene in mit *B. henselae* infizierten HUVE-Zellen. Die Analyse der Geninduktion von VEGF und IL-8 erfolgte mittels RT-PCR und quantitativer RT-PCR am *LightCycler*. HUVE-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250) bzw. mit *B. henselae* (MOI 500) und *B. henselae* BadA⁻ (MOI 500) infiziert und über 2 h, 6 h und 24 h inkubiert. Es wurden die VEGF-Isotypen VEGF_{121, 165, 189, 206} dargestellt. Als interne Kontrolle für die konventionelle PCR diente β -Aktin, das gleiche Bandenintensitäten lieferte. Für die quantitative RT-PCR von VEGF bzw. von IL-8 wurden als interne Kontrolle β -2-Mikroglobulin bzw. G-6-PDH verwendet. Als Positivkontrolle dienten mit PMA (25 ng/ml) behandelte Zellen. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Proben pro Gruppe dar. K: Kontrolle mit nicht-infizierten HUVE-Zellen; *B.h.*: *B. henselae*-infizierte HUVE-Zellen; BadA⁻: *B. henselae* BadA⁻-infizierte HUVE-Zellen. SI: Stimulationsindex.

Wiederum wurde die VEGF- und IL-8-mRNA-Induktion nach Infektion mit *B. henselae* BadA⁻ im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dafür infizierte man HUVE-Zellen über 2 h mit *B. henselae* BadA⁻ (MOI 500) und extrahierte anschließend die mRNA. Die resultierende Geninduktion in HUVEC nach Infektion mit *B. henselae* BadA⁻ lag, wie auch bei HeLa 229-Zellen, unterhalb der Induktion, die durch den *B. henselae* Wildtyp erreicht wurde. Die VEGF-mRNA bei mit *B. henselae* BadA⁻ infizierten Zellen wurde 2,3-mal und die IL-8-mRNA 7,4-mal niedriger exprimiert als bei Infektion mit dem Wildtyp (Abb. 8). Auch hier konnte so eine Korrelation zwischen der BadA-Expression und der Zytokininduktion durch *B. henselae* nachgewiesen werden.

3.1.3 Induktion von VEGF-mRNA in Mono Mac 6- und EA.hy 926-Zellen

Da *B. henselae* in HeLa 229- und HUVE-Zellen VEGF-mRNA induzieren, sollte untersucht werden, ob auch andere Zelllinien derart reagieren. Zunächst sollte die VEGF-Induktion in Mono Mac 6-Zellen, abhängig von der Bartonellendichte, erfasst werden. Mono Mac 6-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 100, 250) infiziert und nach 1, 3 und 6 h die mRNA isoliert. Diese wurde quantifiziert, in cDNA umgewandelt und eine VEGF- sowie eine β -Aktin-PCR durchgeführt. Die *Primer* für VEGF erfassten die VEGF-Isoformen_{121, 165, 189, 206}. Nach einer Stunde wurde nur bei hoher Bakterienzahl eine mRNA-Induktion für VEGF₁₆₅ beobachtet. Ab einer 3-stündigen Infektion war, unabhängig von der Bakterienzahl, eine Induktion der Isoformen VEGF_{121, 165, 189} zu erkennen. VEGF₂₀₆-mRNA scheint erst bei höherer Bakterienzahl induziert zu werden (Abb. 9).

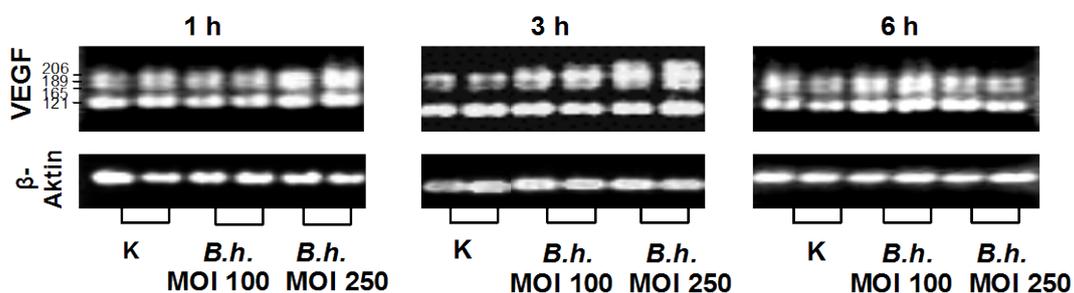


Abb. 9: VEGF-Geninduktion in mit *B. henselae* infizierten Mono Mac 6-Zellen. Die Analyse der Geninduktion erfolgte mittels RT-PCR. Mono Mac 6-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 100, 250) über 1 h, 3 h und 6 h infiziert. Es wurden die VEGF-Isotypen VEGF_{121, 165, 189, 206} dargestellt. Als interne Kontrolle für die RT-PCR diente β -Aktin, das gleiche Bandenintensitäten lieferte. K: Kontrolle mit nicht-infizierten Zellen; *B.h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen.

Nach 6 h lag bei den MM6, die mit geringer Bakterienzahl (MOI 100) infiziert wurden, eine klare VEGF-Geninduktion vor. Bei einer MOI von 250 war im Vergleich zur Kontrolle kein starker Unterschied ersichtlich. Es wurde gezeigt, dass MM6 die vier VEGF-Isoformen exprimieren können und eine Infektion mit *B. henselae* bereits nach 1 h zur VEGF-Induktion führt. Da die frühe Induktion von der Bakterienzahl abzuhängen scheint, kann vermutet werden, dass die Rate bakterieller Regulationsmechanismen die VEGF-Induktion beeinflusst.

Schließlich wurden EA.hy 926-Zellen mit *B. henselae* infiziert und die mRNA isoliert. Nach 6 h war auch hier in mit *B. henselae* infizierten Zellen eine Induktion von VEGF₁₆₅ zu erkennen. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde eine 2,4-fache Induktion der VEGF-mRNA in infizierten EA.hy 926-Zellen gegenüber der Kontrolle nachgewiesen (Abb. 10).

Zusammenfassend führt die Infektion von HeLa 229-, HUVE-, Mono Mac 6- und EA.hy 926-Zellen mit *B. henselae* spätestens nach 6 h zu einer Induktion der VEGF-mRNA. Dies deutet an, dass die VEGF-modulierende Fähigkeit von *B. henselae* zu den wichtigen Pathogenitätsmechanismen des Bakteriums zählt.

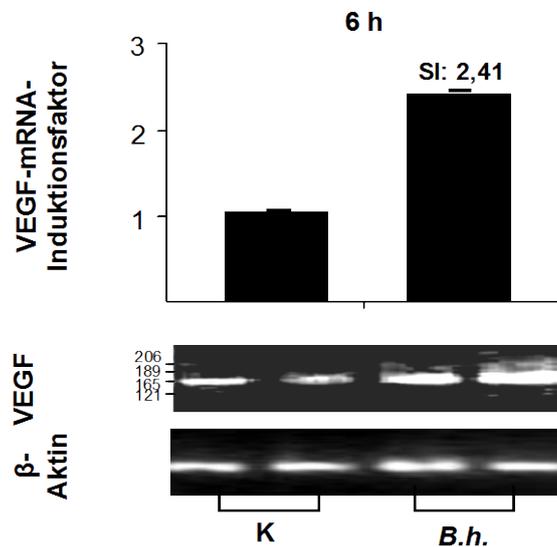


Abb. 10: Geninduktion auf mRNA-Ebene in mit *B. henselae* infizierten EA.hy 926-Zellen. Die Analyse der VEGF-Induktion erfolgte mittels RT-PCR und quantitativer RT-PCR am *Light-Cycler*. EA.hy 926-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250) infiziert und 6h inkubiert. Es wurden die VEGF-Isotypen VEGF₁₂₁, ₁₆₅, ₁₈₉, ₂₀₆ dargestellt. Als interne Kontrolle für die konventionelle PCR diente das *house-keeping gene* β -Aktin, das gleiche Bandenintensitäten lieferte. Für die quantitative RT-PCR wurde als interne Kontrolle das *house-keeping gene* β -2-Mikroglobulin verwendet. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Proben pro Gruppe dar. K: Kontrolle mit nicht-infizierten Zellen; B.h.: *B. henselae*-infizierte Zellen. SI: Stimulationsindex.

3.2 Zytokininduktion durch *B. henselae* in HeLa 229-Zellen

3.2.1 Induktion der VEGF-Sekretion in HeLa 229-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass eine Infektion mit *B. henselae* in HeLa 229-Zellen zur vermehrten Transkription der VEGF-mRNA führt, sollte überprüft werden, ob die Zellen in Folge auch vermehrt das Protein VEGF sezernieren.

Es wurden HeLa 229-Zellen mit *B. henselae* (MOI 250) infiziert und nach 12 h, 24 h und 48 h die VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Es stellte sich heraus, dass infizierte HeLa 229-Zellen eine gesteigerte VEGF-Sekretion aufwiesen, die kontinuierlich mit der Infektionsdauer anstieg (Abb. 11). Eine signifikante Steigerung um das 2-fache der VEGF-Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle konnte ab einer Infektionsdauer von 48 h festgestellt werden.

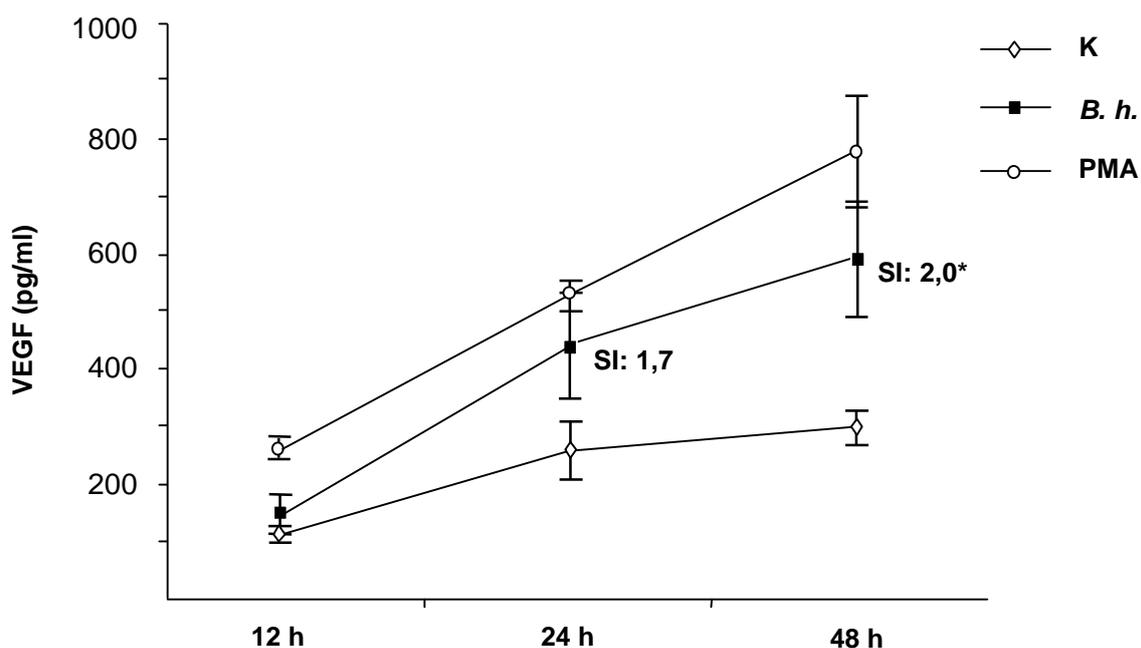


Abb. 11: VEGF-Sekretion in HeLa 229-Zellen 12 h, 24 h und 48 h nach Infektion mit *B. henselae*. Vergleich von nicht-infizierten Zellen mit über 12 h, 24 h und 48 h mit *B. henselae* infizierten HeLa 229-Zellen (MOI 250). Zur Positivkontrolle wurde PMA (25 ng/ml) verwendet. Darstellung der VEGF-Sekretion in pg/ml mittels ELISA. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. K: Kontrolle mit nicht-infizierten HeLa 229 Zellen; *B.h.*: *B. henselae*-infizierte HeLa 229-Zellen (MOI 250). SI: Stimulationsindex. * signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit $p < 0,05$.

3.2.2 Induktion der IL-8-Sekretion in HeLa 229-Zellen

Es stellte sich die Frage, ob *B. henselae* auch eine erhöhte IL-8-Proteinbiosynthese auslösen. Hierfür wurden HeLa 229-Zellen mit *B. henselae* infiziert (MOI 250) und die Überstände nach 48 h in einem IL-8-ELISA vermessen. Es wurde gezeigt, dass IL-8 im Vergleich zur Negativkontrolle von infizierten Zellen vermehrt sezerniert wurde (Abb. 12).

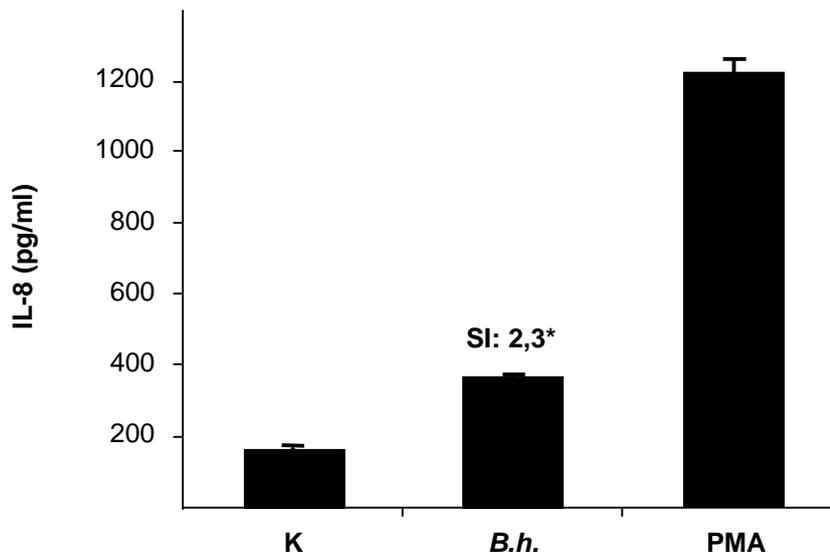


Abb. 12: IL-8-Sekretion in HeLa 229-Zellen 48 h nach Infektion mit *B. henselae*. Vergleich von *B. henselae*-infizierten HeLa 229-Zellen (MOI 250) mit nicht-infizierten Zellen. Als Positivkontrolle wurde PMA (25 ng/ml) verwendet. Darstellung der IL-8-Sekretion in pg/ml mittels ELISA. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. K: Kontrolle mit nicht-infizierten Zellen; *B.h.*: *B. henselae*-infizierte HeLa 229-Zellen. SI: Stimulationsindex. * signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit $p < 0,05$.

3.2.3 Einfluss von hitzegetöteten und Gentamicin-behandelten *B. henselae* auf die Zytokinsekretion von HeLa 229-Zellen

Es wurde gezeigt, dass viable *B. henselae* VEGF induzieren [diese Arbeit; Kempf *et al.*, 2001a]. VEGF kann durch Stimulation der Angiogenese und Inhibition apoptotischer Prozesse viabilitätssteigernd auf EZ wirken [Gerber *et al.*, 1998; Nör *et al.*, 1999; Tran *et al.*, 1999]. Allerdings scheinen selbst durch Gentamicin oder hitzegetötete *B. henselae* immer noch ein antiapoptotisches Potential zu besitzen (vgl. Kap. 3.4.-3.6.) [Schairer, 2004]. So kann dieser Effekt nicht nur auf das viable Bakterium und auf die VEGF-Induktion zurückgeführt werden, sondern auch andere Faktoren - wie z.B. Membranproteine - könnten

eine Rolle spielen. Deshalb wurde geprüft, ob die mit der *B. henselae*-Infektion einhergehende Zytokininduktion ebenfalls von der Viabilität des Bakteriums abhängt. HeLa 229-Zellen wurden mit *B. henselae* sowie mit hitzegetöteten *B. henselae* infiziert. Nach 1 h fügte man einer Gruppe viabler *B. henselae* Gentamicin hinzu, um extrazelluläre Bakterien abzutöten. Nach insgesamt 48 h wurden die VEGF- und IL-8-Konzentrationen im Überstand mittels ELISA vermessen. Im Gegensatz zur Infektion mit viablen *B. henselae* konnte bei Infektion mit nicht-viablen *B. henselae* keine Zunahme der Zytokinsekretion festgestellt werden (Abb. 13).

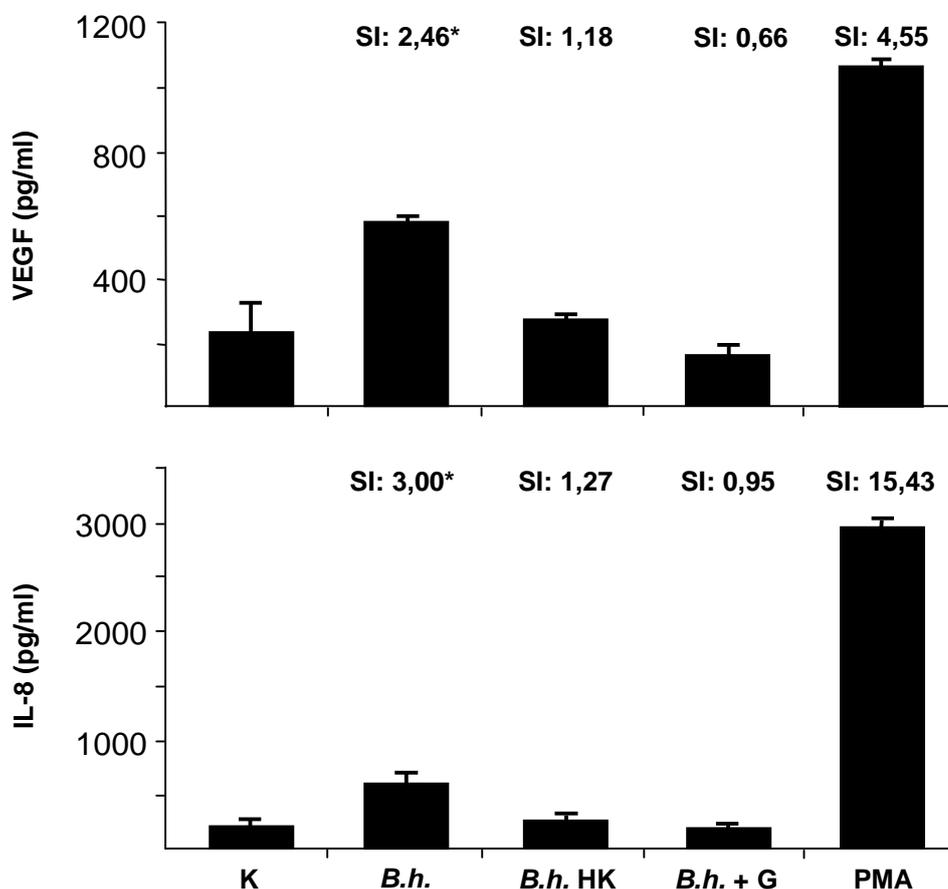


Abb. 13: VEGF- und IL-8-Sekretion von HeLa 229-Zellen, 48 h nach *B. henselae*-Infektion. Vergleich von mit *B. henselae* infizierten Zellen (MOI 250), mit hitzegetöteten *B. henselae* infizierten Zellen sowie mit *B. henselae* infizierten Zellen, denen nach 1 h Gentamicin zugefügt wurde. Darstellung der VEGF- und IL-8-Sekretion in pg/ml mittels ELISA. Als Positivkontrolle wurde PMA (25 ng/ml), als Negativkontrolle nicht-infizierte Zellen verwendet. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. K: Kontrolle mit nicht-infizierten HeLa 229-Zellen; *B.h.*: *B. henselae*-infizierte HeLa 229-Zellen; *B.h.* HK: mit hitzegetöteten (*heat killed*) *B. henselae* infizierte HeLa 229-Zellen (MOI 250); *B.h.* + G: mit *B. henselae* infizierte HeLa 229-Zellen (MOI 250) und Zugabe von Gentamicin nach 1 h. SI: Stimulationsindex. * signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit $p < 0,05$.

Somit wird die eintretende Zytokininduktion durch viable Bartonellen ausgelöst. Da bekannt ist, dass *B. henselae*, die das *Bartonella* Adhäsion A exprimieren, zu einer höheren VEGF-Stimulation innerhalb der Wirtszelle führen als BadA-negative *B. henselae*, ist es möglich, dass die VEGF-Induktion, abhängig von Adhäsion und Invasion, von viablen Bakterien - vermittelt durch BadA - erfolgt [Kempf *et al.*, 2001a]. Das NF- κ B-regulierte IL-8 könnte unter anderem durch den Einfluss des VirB-Typ-IV-Sekretionssystems des Bakteriums mitreguliert werden [Fuhrmann *et al.*, 2001].

3.3 Geninduktion in verschiedenen Zelllinien durch *B. henselae*

3.3.1 Auslösung eines angiogenetischen Programms in HeLa 229-Zellen durch *B. henselae*

In einem nächsten Schritt sollte die Genexpression von mit *B. henselae* infizierten (MOI 250) HeLa 229-Zellen mittels Gen-Chips von Affymetrix analysiert werden. Zuvor wurde nach 6-stündiger Infektionsdauer die mRNA isoliert und der Infektionserfolg anhand der VEGF-Induktion (3,6 und 3,9-fach, Daten nicht gezeigt) in einer quantitativen RT-PCR untersucht.

Bei der Synthese der Doppelstrang-DNA (ds-DNA) wurden je 5 μ g der Proben-RNA mit einer Ratio von 2,02-2,06 eingesetzt und das *SuperScript ds-cDNA Synthese Kit* (Invitrogen) verwendet. Die cDNA wurde mit Hilfe des *Enzo BioArrayTM High YieldTMRNA Transcript Labeling Kits* von Affymetrix mit Biotin markiert. Bei dem Experiment kam das *Microarray Human Genome 95Av2* mit 12625 abgebildeten Genen zum Einsatz. Die Arrays 1 und 2 wurden mit der mRNA der nicht-infizierten, die Arrays 3 und 4 mit der der mit *B. henselae*-infizierten Zellen hybridisiert. Dabei - sowie bei der Färbung und dem Waschvorgang - hielt man sich an die Angaben des Herstellers (Affymetrix, *GeneChip[®] Expression Analysis Technical Manual*). Mit dem *Agilent GeneArray[®] Scanner* wurde das Array bei 570 nm gescannt. Die Nachbearbeitung erfolgte mit der Software *Affymetrix[®]Microarray suite version 5.0*, *Affymetrix MicroDB 3.0* und *Data Mining Tool Version 3.0*. Die 3'-5' Ratio ergab als interne Kontrolle Werte zwischen 0,9 und 1,1 (Kooperationsprojekt mit Dr. Alitalo, K., Universität Helsinki, Finnland und Dr. Kempf, V.A., Universität Tübingen, Deutschland). Bei

einer Signalrate von 0,7 (entsprechend einer 1,5-fachen Induktion) unterschieden sich die Arrays 1 und 3 in 96 Genen. Beim Abgleich der Arrays 2 und 4 fand man 104 unterschiedlich regulierte Gene. Da allerdings insgesamt nur 60 Gene in beiden Arraypaaren übereinstimmten, wurden nur die Gene ausgewählt, die eine Änderung der Signalrate (*signal ratio*) über 0,99 oder unter -0,99 aufwiesen, wobei eine *signal ratio* von 0,99 einer 2-fachen Induktion entspricht. Beim Vergleich der beiden Arraypaare gab es dabei ausschließlich Übereinstimmungen. Als interne Kontrolle ergab das Array eine 3,43- bzw. eine 3,61-fache VEGF-A-Induktion, was sich mit den Werten der vorherigen PCR deckte.

Insgesamt wiesen 20 Gene eine mehr als 2-fache Induktion auf. Herabregulierte Gene wurden nicht gefunden (Tab. 26). Interessanterweise blieb die Signalstärke der proinflammatorischen Gene, abgesehen von IL-8, nahezu unverändert. Neben IL-8 und VEGF identifizierte man noch vier weitere angioproliferative Gene: ADM, EFNA-1, IGFBP-3 und ET-2 [Leung *et al.*, 1989; Koch *et al.*, 1992; Pandey *et al.*, 1995; Yancopoulos *et al.*, 1998; Kahn *et al.*, 2000; Öhler *et al.*, 2002; Marvin *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2003]. Weitere drei Gene sind von großer Bedeutung für den Energiestoffwechsel der Zelle. Bei ihnen handelt es sich um HK2, das den Schlüsselschritt der Glykolyse reguliert, um ENO2 und um SLC2A3 [Arora *et al.*, 1990; Semenza *et al.*, 2001]. Von acht anderen Genen (NDRG1, STC-2, MAFF, NFIL3, CCNG2, HCN2, MX11, PAK) weiß man, dass sie für die Signaltransduktion und den Zellzyklus wichtig sind [Hunter und Pines, 1991; Gottschalk *et al.*, 1993; Motohashi *et al.*, 1997; Knaus und Bokoch, 1998; O'Hagan *et al.*, 2000; Salnikow *et al.*, 2000]. Den verbleibenden Genen KIAA0742, FLJ22182fis und FLJ20500 kann man bisher keine Funktion zuschreiben. Allerdings war besonders auffällig, dass mindestens 11 der gefundenen Gene (ADM, EFNA-1, VEGF, IGFBP-3, ET-2, NDRG1, STC-2, CCNG2, ENO2, SLC2A3 und HK2) bekanntermaßen von HIF-1 reguliert werden. NFIL3 und PAK werden ebenfalls bei Hypoxie vermehrt exprimiert und nicht zuletzt verfügt FLJ20500 über ein HRE (*hypoxia response element*). Zusammenfassend spricht dieses Profil der HeLa 229-Zellen dafür, dass *B. henselae* vermutlich durch die Stimulation von HIF-1 eine proangiogenetische Antwort innerhalb der Wirtszelle auszulösen vermag.

Tab. 26: Genexpression in HeLa 229- Zellen 6 h nach Infektion mit *B. henselae*; Mikroarraydaten

Bereich	Gen	Induktion / Array	Induktion / RT-PCR <i>LightCycler</i>	Transkriptionsfaktor	Funktion
Gefäßproliferation	Interleukin-8 / IL-8	6,41	5,80 ¹	NF-κB	Angioproliferativ, proinflammatorisch
	Adrenomedullin / ADM	3,88	Ja	HIF-1	Angioproliferativ
	Ephrin A1 / EFNA1	3,74	n.d.	HIF-1	Modulation der Angioproliferation
	<i>vascular endothelial growth factor</i> / VEGF	3,54	3,75 ¹	HIF-1	Angioproliferativ
	<i>insulin-like growth factor binding protein 3</i> / IGFBP-3	2,67	Ja ²	HIF-1	Angioproliferativ
	Endothelin 2 / ET-2	2,13	n.d.	HIF-1	Modulation der Angioproliferation
Glykolyse	Hexokinase 2 / HK2	4,37	Ja ²	HIF-1	Schlüsselschritt der Glykolyse
	<i>glucose transport protein 3</i> / SLC2A3	2,87	n.d.	HIF-1	Regulation des Glucosetransports in die Zelle
	Enolase 2 / ENO2	2,82	n.d.	HIF-1	Glykolyse
	Stanniocalcin-2 / STC2	5,18	Ja ²	HIF-1	Signaltransduktion
	<i>N-myc downstream regulated gene 1</i> / NDRG1	4,85	Ja ²	HIF-1	Transmission
	<i>musculoaponeurotic fibrosarcoma</i> / v-maf <i>oncogene homolog</i>	4,45	n.d.	?	Transkription des Pol2 Promotors
Signaltransduktion	<i>nuclear factor IL-3 regulated</i> / NFIL3	2,90	n.d.	HIF-1	Transkription des Pol2 Promotors
	<i>cyclin G2</i> / CCNG2	2,77	Ja ²	HIF-1	Kontrolle des Zellzyklus
	<i>hyperpolarization activated cyclic, nucleotide gated potassium channel 2</i> / HCN2	2,68	n.d.	?	Transmission
	<i>Max-interacting protein 1</i> / MXI1	2,51	n.d.	?	Kontrolle des Zellzyklus
	<i>P21-activated kinase 2</i> / PAK2	2,26	n.d.	HIF-1	Signaltransduktion
	KIAA0742 <i>protein</i> / KIAA0742	3,70	Ja ²	?	Unbekannt
Unbekannt	<i>homo sapiens cDNA</i> / FLJ22182fis	2,85	Ja ²	?	Unbekannt
	<i>hypothetical protein</i> / FLJ20500	2,59	n.d.	HIF-1	Unbekannt

¹.x-fache Induktion (*LightCycler*), verglichen mit der Negativkontrolle.

².Nachweis mit konventioneller PCR (Kooperationsprojekt mit M. Lebedziejewski).
n.d.: nicht durchgeführt.

3.3.2 Auslösung eines angiogenetischen Programms in HUVE-Zellen durch *B. henselae*

Um eine Aussage über das Genexpressionsmuster von HUVEC machen zu können, wurden diese mit *B. henselae* (MOI 500) infiziert und nach 6 h die mRNA isoliert. Der Infektionserfolg wurde mit einer PCR durch Nachweis der Induktion von VEGF (2,2- und 3,0-fach) und von IL-8 (5,3- und 6,4-fach) überprüft (Daten nicht gezeigt). Diesmal kam der Affymetrix Standardarray U133A zum Einsatz. Insgesamt fand man 75 Gene, wobei 69 Gene herauf- und 6 herabreguliert wurden (Anhang Tab. 28; Kooperationsprojekt mit Dr. Müller,S.; Dr. Bonin,M. und Lebidziejewsky,M., Universität Tübingen). Die folgende Tabelle beschränkt sich auf eine Zusammenfassung der induzierten und NF- κ B- sowie HIF-1-regulierten Gene, wobei die Informationen der Datenbank *Gene ontology* entnommen wurden (Tab. 27).

Als angiogene Modulatoren identifizierte man IL-8, ANGPTL4, VEGF und ADM, wobei die letzten beiden bekanntermaßen von HIF-1 reguliert werden. Zu den Genen, die in die Apoptose eingreifen, zählen ANGPTL4, MCP-1, TNF-AIP3 (NF- κ B) und das RTP801 (HIF-1). Viele der gefundenen, überwiegend von NF- κ B regulierten Gene sind von Bedeutung (MCP-1, CXCL1, CXCL 2, CXCL 3, SELE, IL-8, CSF2, ICAM1, VCAM1, IL-6 und COX2). SLC2A3 bzw. GLUT3, die von HIF-1 reguliert werden, modulieren stattdessen den Zellstoffwechsel. Auch Gene, die für die Signaltransduktion wichtig sind, wurden detektiert. Zu ihnen zählen NF- κ B α , BCL3 und BHLHB2. Erstere werden durch NF- κ B reguliert, während BHLHB2 wiederum durch HIF-1 kontrolliert wird. Zudem konnte viele weitere Gene, die von anderen Transkriptionsfaktoren reguliert werden und z.B. im Rahmen der Karzinogenese, Spermatogenese und Stressantwort wirken, identifiziert werden (Tab. 28).

Vergleicht man die gesammelten Arraydaten der infizierten HUVE-Zellen mit denen der HeLa 229-Zellen (vgl. 3.3.1), so stellt man fest, dass einige gleiche Gene aktiviert wurden - nämlich VEGF, IL-8, ADM und SLC2A3. Allerdings führen *B. henselae* in HUVE-Zellen zu einer breiteren mRNA-Antwort, was sich in einem größeren Spektrum der Genexpression widerspiegelt und in einer umfassenden Genregulation resultiert.

Tab. 27: Genexpression von NF-κB- oder HIF-1-regulierten Genen in HUVE-Zellen 6 h nach Infektion mit *B. henselae* Mikroarraydaten

Bereich	Gen	Induktion / Array	Transkriptionsfaktor	Funktion
NF-κB-regulierte Gene				
Gefäßproliferation	Interleukin-8 / IL-8	4,59	NF-κB	Angioproliferativ, proinflammatorisch
	<i>colony stimulating factor 2 / CSF2</i>	18,51	NF-κB	Proinflammatorisch, Kontrolle von Wachstum, Differenzierung, hämatopoetisch
Entzündung	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2 / MCP-1</i>	11,63	NF-κB	Chemotaxis, antiapoptotisch
	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 3 / CXCL3</i>	9,71	NF-κB	Chemotaxis, Wachstumsfaktoren für Melanomzellen, proinflammatorisch
	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1 / CXCL1</i>	9,58	NF-κB	
	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 2 / CXCL2</i>	7,41	NF-κB	
	<i>E-Selectin / SELE</i>	5,90	NF-κB	Inflammatorisch, Zelladhäsion
	<i>intercellular adhesion molecule / ICAM1</i>	4,14	NF-κB	Inflammatorisch, bei Invasion von Bakterien
	<i>TNF- α-induced protein 3 / TNFAIP3</i>	3,92	NF-κB	Inflammatorisch/Regulation der Apoptose
	<i>prostaglandin-endoperoxide-synthase 2 / PTGS2, COX2</i>	1,97	NF-κB / CRE	Funktionen in Karzinogenese und Angiogenese, antiapoptotisch
	Interleukin-6, interferon / IL-6	1,83	NF-κB	Immunantwort, Karzinogenese
	Signaltransduktion	B-cell CLL / lymphoma 3 / BCL3	2,95	NF-κB / Jak / STAT
	<i>vascular adhaesions molecule 1 / VCAM1</i>	1,97	NF-κB / IRF-1	Induziert von ADM, Adhäsion, Entzündung
Inhibition von NF-κB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer B-cells inhibitor, alpha / NF-κB1α</i>	4,11	?	Inhibitor von NF-κB
HIF-1-regulierte Gene				
Gefäßproliferation	Angiopoetin-like 4 / ANGPTL4	5,28	PPARα / HIF-1	Hypoxie induziert, Funktion innerhalb von Karzinogenese und Angiogenese
	<i>vascular endothelial growth factor / VEGF</i>	2,69	HIF-1	Angioproliferativ
	Adrenomedullin / ADM	2,31	HIF-1	Angioproliferativ
Glykolyse	<i>solute carrier member 2, family 3; glucose transport protein 3 / SLC2A3, GLUT3</i>	2,20	HIF-1	Regulation des Glukosetransports in die Zelle
Apoptoseregulation	HIF-1 - response RTP801 / RTP801	2,07	HIF-1	Antiapoptotisch
	<i>basic-helix loop-helixdomain containing, Class B 2 / BHLHB2</i>	1,87	HIF-1	Kontrolle der Apoptose, des Wachstum und der Differenzierung von Zellen

* Angaben zum Transkriptionsfaktor und der Funktion wurden der Datenbank Gene ontology (<http://www.geneontology.org>) entnommen (Kooperationsprojekt mit Dr. Bonin, M., Dr. Müller, S. und Dr. M. Lebedziejewsky, Universität Tübingen).

3.4 Zellviabilität und VEGF-Sekretion nach einer Infektion mit *B. henselae* und anderen Bakterien

3.4.1 Kinetik der Zellviabilitätsänderung mittels Zytotoxizitätstest

Es sollte überprüft werden, inwiefern *B. henselae* im Vergleich zu anderen Bakterien die Zellviabilität von infizierten HeLa 229-Zellen beeinflusst, bzw. ob die Steigerung der Zellviabilität im Rahmen der *B. henselae*-Infektion spezifisch für das Bakterium ist. Hierfür wurden HeLa 229-Zellen für 12 h, 24 h bzw. 48 h mit *B. henselae*, *Y. enterocolitica* pYV⁺ und pYV⁻, *E. coli* HB 101 und HB 101 inv⁺, *L. pneumophila* sowie mit *L. monocytogenes* infiziert und danach der Zellrasen mikroskopisch dokumentiert (Abb. 14a).

Nach 12 h war zwischen den Gruppen noch kein großer Unterschied sichtbar. Erst nach 24 h zeigte sich, dass die Kontrolle und die mit *B. henselae* infizierten Zellen in einem besseren Zustand waren. Im weiteren Verlauf (48 h) war deutlich zu erkennen, dass die Viabilität der *B. henselae*-infizierten Zellen höher und der Zellrasen intakter war als die der Vergleichsgruppen, bei denen die Zellen überwiegend zerstört waren. Auch im Vergleich zur Kontrollgruppe erschien der Zellrasen der *B. henselae*-infizierten Zellen nach 48 h stabiler, was dafür spricht, dass nicht-infizierte Zellen (z.B. infolge des Nährstoffverbrauchs) untergingen und *B. henselae* den Stoffwechsel der Zellen stark moduliert. Somit wurde gezeigt, dass *B. henselae* die Viabilität von HeLa 229-Zellen verbessern, was als Ausdruck der Apoptoseinhibition, aber auch der Angiogeneseinduktion durch *B. henselae* bewertet werden kann (Abb. 14a).

3.4.2 Kinetik der Zellviabilitätsänderung mittels MTS-Assay

Zur Prüfung der erhaltenen Daten, wurde ein MTS-Assay durchgeführt. HeLa 229-Zellen wurden im 96-well-Format mit *B. henselae*, *Y. enterocolitica* pYV⁺ und pYV⁻, *E. coli* HB 101 und HB 101 inv⁺, *L. pneumophila* sowie *L. monocytogenes* infiziert. Als Positivkontrolle dienten mit PMA stimulierte Zellen. Die Viabilität wurde nach 12 h, 24 h und 48 h photometrisch gemessen (Abb. 14b). Dabei wurde gezeigt, dass die Viabilität der *B. henselae*-infizierten Zellen nicht nur höher war als die der mit anderen Bakterien infizierten Zellen, sondern auch höher war als die der Negativkontrolle.

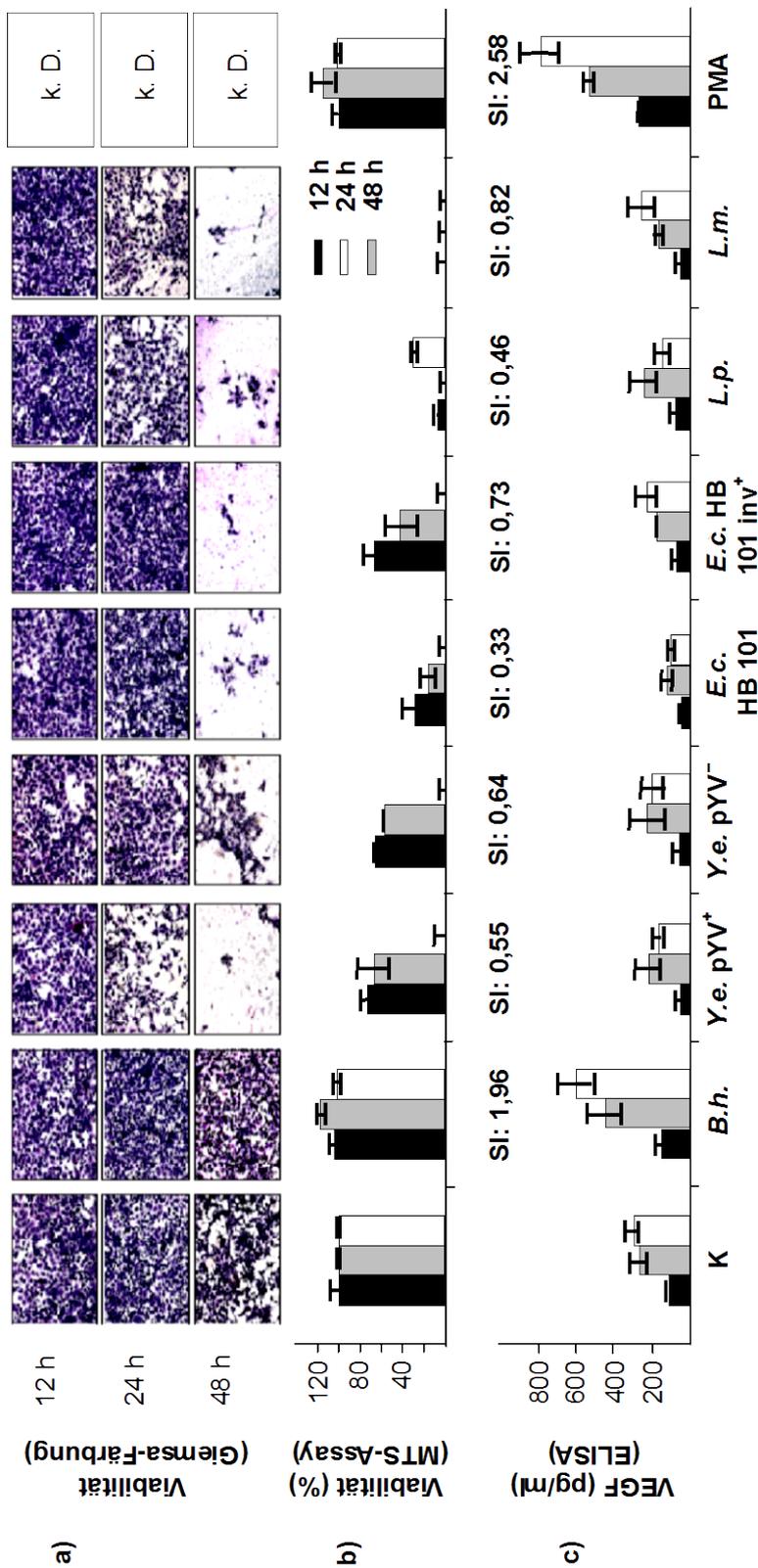


Abb. 14a-c: Kinetik der Viabilität und der VEGF-Produktion von HeLa 229-Zellen nach Infektion (über 12 h, 24 h, 48 h) mit *B. henselae* (MOI 250), *Y. enterocolitica* pYV⁺, pYV⁻ (MOI 20), *E. coli* HB 101, HB 101 inv⁺ (MOI 100), *L. pneumophila* (MOI 100) und *L. monozytogenes* (MOI 100). Darstellung der Viabilität mittels Giemsa-Färbung (a) und mittels MTS-Assay (b). Die Viabilität der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. Darstellung der VEGF-Sekretion in pg/ml mittels ELISA (c). Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Proben pro Gruppe dar. Für die Positivkontrolle wurden HeLa 229-Zellen mit PMA (25 ng/ml) behandelt. K: Kontrolle (nicht-infizierte Zellen), B.h.: mit *B. henselae*; Y.e. pYV⁺: mit *Y. enterocolitica* pYV⁺; Y.e. pYV⁻: mit *Y. enterocolitica* pYV⁻; E.c. HB101: mit *E. coli* HB 101⁻; E.c. HB101 inv⁺: mit *E. coli* HB 101 inv⁺; L.p.: mit *L. pneumophila*- und L.m.: mit *L. monozytogenes*-infizierte Zellen. SI: Stimulationsindex (nach 48 h).

Nach 12 h war ein Unterschied zwischen den Viabilitäten zu erkennen, wobei die mit *B. henselae* infizierten Zellen die höchsten Werte lieferten. Interessanterweise waren die Werte der nicht mit *B. henselae* infizierten Zellen bereits nach 24 h deutlich gesunken. Dies konnte mit der Giemsa-Färbung nicht gezeigt werden und kann z.B. auf den frühen bakteriellen Einfluss auf den Zellstoffwechsel zurückzuführen sein. Nach 48 h entsprechen die Viabilitätswerte dem mikroskopischen Bild. Nahezu alle Zellen, die nicht mit *B. henselae* infiziert oder mit PMA behandelt wurden, sind zu Grunde gegangen. Dies belegt, dass *B. henselae* in HeLa 229-Zellen zu einer Viabilitätssteigerung führen.

3.4.3 Kinetik der VEGF-Sekretion nach Infektion mit *B. henselae*

Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen der Viabilität und der VEGF-Produktion der Zellen untersucht. Hierbei wurde auch kontrolliert, ob die VEGF-Induktion für *B. henselae* spezifisch ist oder ob auch andere gramnegative Bakterien die VEGF-Sekretion in der Wirtszelle auslösen. Im Experiment konnte eine gesteigerte VEGF-Synthese in HeLa 229-Zellen aber nur nach Infektion mit *B. henselae* nachgewiesen werden, wobei nach 48-stündiger Infektion eine VEGF-Induktion um das ca. 2-fache nachgewiesen werden konnte (Abb. 14c). Dies zeigt, dass die Anregung zur vermehrten VEGF-Produktion eine spezifische Eigenschaft von *B. henselae* ist.

3.5 Abhängigkeit der Viabilitätsänderung und der VEGF-Sekretion von der ablaufenden Infektion mit *B. henselae* und anderen Bakterien in HeLa 229-Zellen

3.5.1 Nachweis der Zellviabilität mittels Zytotoxizitätstest

Nun wurde überprüft, ob die erhöhte Viabilität und die angiogene Genexpression der Zellen auch von der Viabilität der *B. henselae* selbst abhängen. HeLa 229-Zellen wurden mit *B. henselae*, *Y. enterocolitica* pYV⁺ und pYV⁻, *E. coli* HB 101 und HB 101 inv⁺, *L. pneumophila* sowie *L. monocytogenes* infiziert. Nach 18 h wurde Gentamicin hinzugefügt, um extrazelluläre Bakterien abzutöten. Nach 48 h erfolgte die Analyse mit Hilfe einer Giemsa-Färbung.

Sowohl nicht-infizierte als auch *B. henselae*-infizierte Zellen zeigten, unabhängig von der Zugabe von Gentamicin, einen ähnlich guten Zustand der Zellkultur (Abb. 15a). Ansonsten waren die infizierten Zellen, die nach 18 h mit Gentamicin behandelt wurden, in einem besseren Zustand als die Zellen, die über 48 h den viablen Bakterien ausgesetzt waren. Insgesamt ähnelte das Bild aller mit Gentamicin behandelten Zellen dem der Negativkontrolle. Dies könnte z.B. darauf zurückgeführt werden, dass die Bakterien durch das Antibiotikum abgetötet bzw. derart geschädigt wurden, dass die Zellen kaum betroffen waren bzw. sich bereits geschädigte Zellen wieder regenerieren konnten.

3.5.2 Nachweis der Viabilität mittels MTS-Assay

Parallel zu dem in 3.5.1 beschriebenen Experiment wurde erneut ein MTS-Assay durchgeführt und HeLa 229-Zellen mit *B. henselae*, *Y. enterocolitica* pYV⁺ und pYV⁻, *E. coli* HB 101 und HB 101 inv⁺, *L. monocytogenes* sowie *L. pneumophila* infiziert. Nach 18 h wurde zum Abbruch der Infektion einer Gruppe Gentamicin zugesetzt und nach 48 h die Viabilität vermessen. Die Viabilität der infizierten Zellen war dabei nach Zugabe von Gentamicin durchgängig besser, wobei die Viabilität der mit *B. henselae* infizierten Zellen die höchsten Werte lieferte (Abb. 15b). Es fällt auf, dass trotz Abtötung der *B. henselae* mit Gentamicin deren Viabilität immer noch hoch ausfällt. Dies könnte einerseits dafür sprechen, dass die viabilitätssteigernde Eigenschaft nicht nur auf viable Bakterien zurückzuführen ist, sondern auch dass präformierte Faktoren von *B. henselae* ursächlich sein könnten. Andererseits könnte *B. henselae* auch bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt die bekannten Effekte induziert haben.

Es bestätigte sich auch die geäußerte Vermutung, dass einige Bakterien bereits zu einem frühen Zeitpunkt einer bakteriellen Infektion in zelluläre Abläufe eingreifen und dadurch die Zellen derart beeinträchtigen, dass es nicht mehr zu einer Regeneration der Zellen kommen kann - selbst wenn der Zellverband an sich noch intakt erscheint. So liegt die Viabilität der mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ und *E. coli* HB 101-infizierten Zellen deutlich unterhalb der Viabilität der Negativkontrolle, und zwar unabhängig von der Abtötung der Bakterien durch Gentamicin.

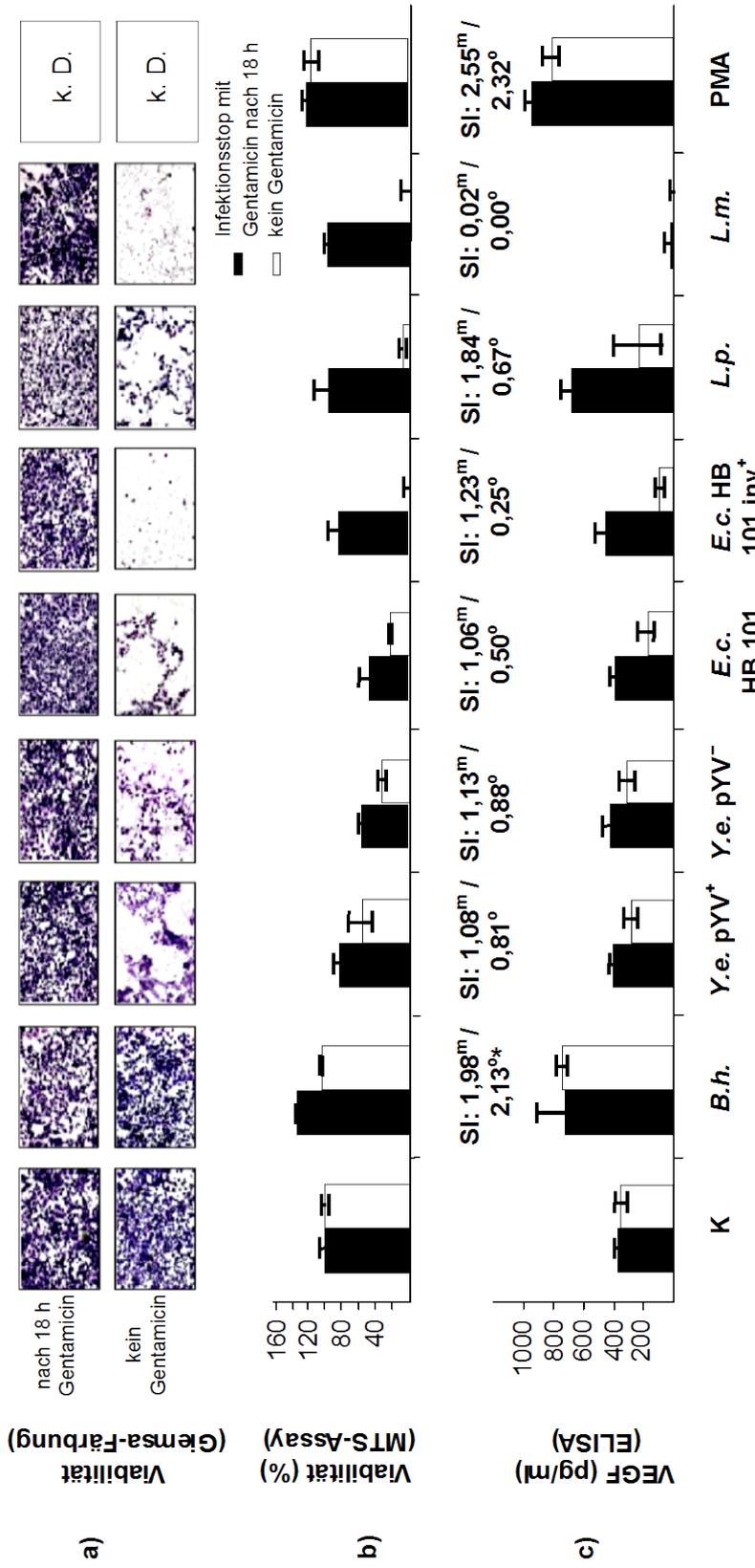


Abb. 15a-c: Gegenüberstellung der Zellviabilität und VEGF-Produktion von HeLa 229-Zellen nach 48-stündiger Infektion mit *B. henselae* und anderen Bakterien mit und ohne Zugabe von Gentamicin nach 18 h zur Durchbrechung der Infektion. Darstellung der Viabilität mittels Giemsa-Färbung (a) und mittels MTS-Assay (b). Die Viabilität der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Darstellung der VEGF-Sekretion in pg/ml mittels ELISA (c). Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. Für die Positivkontrolle wurden HeLa-Zellen mit PMA (25 ng/ml) behandelt. K: Kontrolle (nicht-infizierte HeLa 229-Zellen), B.h.: mit *B. henselae*; Y. e. pYV⁻: mit *Y. enterocolitica* pYV⁻; Y. e. pYV⁺: mit *Y. enterocolitica* pYV⁺; E.c. HB101: mit *E. coli* HB 101⁻; E.c. HB101 inv⁺: mit *E. coli* HB 101 inv⁺; L.p.: mit *L. pneumophila*- und L.m.: mit *L. monocytoenes*-infizierte HeLa 229-Zellen. ^m: mit Gentamicin nach 18h; ^o: ohne Gentamicin. *: signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (ohne Gentamicin) mit p < 0,05; SI: Stimulationsindex.

3.5.3 VEGF-Sekretion nach Infektion mit *B. henselae*

Neben der Viabilität der Zellen wurde auch die VEGF-Sekretion nach Infektion mit *B. henselae* und anderen Bakterien quantitativ bestimmt. Nach 48 h wurden die Zellkulturüberstände von HeLa 229-Zellen, die mit *B. henselae*, *Y. enterocolitica* (pYV⁺, pYV⁻), *E. coli* (HB 101, HB 101 inv⁺), *L. pneumophila* sowie *L. monocytogenes* infiziert (mit oder ohne Zugabe von Gentamicin) wurden, abgenommen und die VEGF-Sekretion im VEGF-ELISA untersucht.

Es wurde gezeigt, dass ohne Gentamicinzugabe nur die mit *B. henselae* infizierten Zellen eine gesteigerte VEGF-Sekretion aufwiesen (Abb. 15c). Bei den Vergleichsgruppen war die VEGF-Sekretion der Zellen stark eingeschränkt und lag unterhalb der Negativkontrolle. Bei den mit Gentamicin behandelten Zellen lag die VEGF-Sekretion der HeLa 229-Zellen, die mit *Y. enterocolitica* (pYV⁺, pYV⁻) und *E. coli* (HB 101, HB 101 inv⁺) infiziert wurden, im Bereich der Kontrolle, was für eine fehlende Zellschädigung spricht. Die mit *L. pneumophila* infizierten und mit Gentamicin behandelten Zellen wiesen hingegen eine erhöhte VEGF-Sekretion auf, während die Abtötung von *L. monocytogenes* durch Gentamicin keinen Einfluss auf die VEGF-Sekretion der Zellen hatte.

Bei den mit *B. henselae* infizierten Zellen konnte, unabhängig von Gentamicin, eine hohe VEGF-Sekretion nachgewiesen werden. Da nach Gentamicinzugabe und damit nach Abtötung der extrazellulären Bartonellen (siehe 3.2.2) ebenfalls eine erhöhte VEGF-Sekretion beobachtet werden konnte, müsste die VEGF-Induktion zu den frühen Abläufen der *B. henselae*-Infektion zählen. Dies würde dafür sprechen, dass bei mindestens 18-stündiger Infektion von HeLa 229-Zellen mit *B. henselae* die maximale Induktion auf mRNA-Ebene bereits stattgefunden hat und infolge auch das Abtöten der Bartonellen nur geringe Auswirkungen auf die Translation der VEGF-mRNA hat. So wurde in Kapitel 3.1 bereits gezeigt, dass die maximale VEGF-mRNA-Induktion durch *B. henselae* in HeLa 229-Zellen schon nach 6 h erfolgte und nach einer Infektionsdauer von 24 h wieder abfällt. Eine spätere Abtötung der Bakterien scheint die VEGF-Sekretion der Zellen nur unwesentlich zu beeinflussen. Eine andere Ursache könnte darin liegen, dass *B. henselae* präformierte Proteine besitzt, die unabhängig von der Viabilität des Bakteriums VEGF in der Wirtszelle induzieren.

Es konnte wiederum gezeigt werden, dass *B. henselae* im Gegensatz zu anderen Bakterien fähig ist, zeitabhängig die VEGF-Sekretion in HeLa 229-Zellen zu stimulieren. Auch wenn angenommen wird, dass VEGF nicht für die Apoptoseinhibition durch *B. henselae* verantwortlich ist [Schairer, 2004], so kann vermutet werden, dass eine gesteigerte Sekretion des angioproliferativen Zytokins VEGF synergistisch wirken würde.

3.6 Einfluss von hitzegetöteten Bakterien auf Viabilität und Zytokinproduktion von HeLa 229-Zellen

3.6.1. Zellviabilität nach Infektion mit hitzegetöteten Bakterien

Es sollte überprüft werden, inwiefern sich die Zellviabilität in Abhängigkeit von durch Gentamicin oder durch Hitze abgetöteten Bakterien ändert. Hierfür wurden HeLa 229-Zellen mit viablen oder hitzegetöteten *B. henselae*, *Y. enterocolitica* pYV⁺ und pYV⁻, *E. coli* HB 101 und HB 101 inv⁺ infiziert. Die Infektionsdauer betrug 48 h, wobei entweder kein Gentamicin oder jeweils nach 1 h, 6 h oder 12 h zu einer Versuchsreihe Gentamicin hinzugefügt wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass die Viabilität der mit *B. henselae* behandelten Zellen, unabhängig davon, ob sie durch Hitze oder Gentamicin abgetötet wurden, gegenüber der Negativkontrolle erhöht war. Dies deutet auf präformierte Faktoren von *B. henselae* hin, die für die Viabilitätssteigerung ursächlich sind. Darüber hinaus konnte deutlich gemacht werden, dass unter den viablen Bakterien nur *B. henselae* fähig ist, die Viabilität im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant zu erhöhen. Im Gegensatz dazu liegt die Viabilität der Zellen, die mit anderen viablen gramnegativen Bakterien infiziert wurden, deutlich unterhalb der der Negativkontrolle. Ebenso wird ersichtlich, dass die Viabilität der Zellen, die mit anderen hitzegetöteten Bakterien infiziert wurden, sich ähnlich wie die der Negativkontrolle verhält. Die Tatsache, dass durch das frühe Abtöten der extrazellulären Bakterien nach 1 h durch Zugabe von Gentamicin ein „Anstieg“ der Viabilität zu beobachten ist, deutet an, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht derart durch die Bakterien geschädigt wurden, dass es zu einer Zelldegeneration kommen würde.

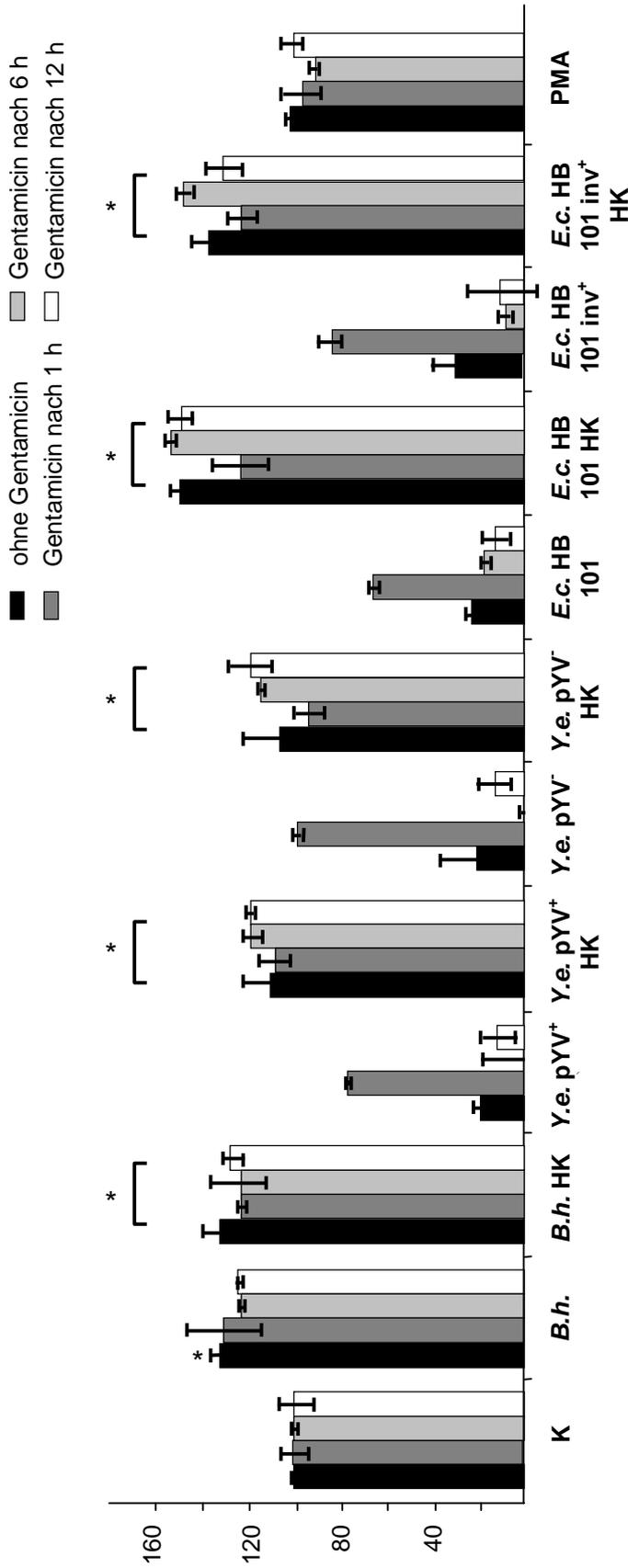


Abb. 16: Gegenüberstellung der Zellviabilität von HeLa 229-Zellen 48h nach Infektion mit *B. henselae*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *Legionella pneumophila* und *Listeria monocytogenes* mit und ohne Zugabe von Gentamicin nach 1 h, 6 h oder 12 h zur Durchbrechung der Infektion. Darstellung der Viabilität mittels MTS-Assay. Mit PMA (25 ng/ml) behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle. Für die Negativkontrolle wurden nicht-infizierte Zellen verwendet. Die Viabilität der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. K: nicht-infizierte Zellen (Negativkontrolle); B.h.: mit *B. henselae*-infizierte Zellen (MOI 250); B.h. HK: mit hitzegetöteten *B. henselae*-behandelte Zellen (MOI 250); Y.e. pYV⁺: mit Y.e. pYV⁺-infizierte Zellen (MOI 20); Y.e. pYV⁻ HK: mit hitzegetöteten Y.e. pYV⁻-behandelte Zellen (MOI 20); Y.e. pYV⁺: mit Y.e. pYV⁺-infizierte Zellen (MOI 20); Y.e. pYV⁻ HK: mit hitzegetöteten Y.e. pYV⁻-behandelte Zellen (MOI 100); E.c. HB 101: mit *E. coli* HB 101-infizierte Zellen (MOI 100); E.c. HB 101 HK: mit hitzegetöteten *E. coli* HB 101-infizierte Zellen (MOI 100); E.c. HB 101 inv⁺: mit *E. coli* HB 101 inv⁺-infizierte Zellen (MOI 100); E.c. HB 101 inv⁺ HK: mit hitzegetöteten *E. coli* HB 101 inv⁺-behandelte Zellen (MOI 100). * signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit $p < 0,05$.

3.6.2. VEGF-Sekretion nach Infektion mit hitzegetöteten Bakterien

Parallel zu dem in 3.6.1 beschriebenen Experiment wurde ein weiterer Versuchsansatz zur Bestimmung der VEGF-Konzentration durchgeführt. Hierfür wurden wiederum HeLa 229-Zellen mit viablen oder hitzegetöteten *B. henselae*, *Y. enterocolitica* pYV⁺ und pYV⁻ sowie *E. coli* HB 101 und HB 101 inv⁺ infiziert. Nach 1 h, 6 h oder 12 h erfolgte die Zugabe von Gentamicin. Die Infektionsdauer betrug 48 h, danach wurde aus den Zellkulturüberständen die vorhandene VEGF-Konzentration im ELISA bestimmt.

Insgesamt wurde deutlich, dass hitzegetötete Bakterien keine signifikante Steigerung der VEGF-Sekretion auslösen und sich die gemessenen Werte ungefähr auf dem Niveau der Negativkontrolle befanden.

Darüber hinaus konnte nochmals nachgewiesen werden, dass innerhalb der Gruppen, denen kein Gentamicin zugesetzt wurde, die mit *B. henselae* infizierten HeLa 229-Zellen die höchste VEGF-Sekretion aufwiesen. In diesem Experiment hatten allerdings hitzegetötete *B. henselae* keinen Einfluss auf die VEGF-Sekretion der Zellen. Dies spricht wiederum dafür, dass zwar für die Viabilitätserhöhende Eigenschaft der *B. henselae* präformierte Faktoren in Frage kommen (vgl. 3.6.1 und 3.5.2), zu diesen aber nicht das in den Zellkulturüberstand sezernierte VEGF beiträgt. Außerdem legt dieser Vergleich nahe, dass VEGF selbst ebenfalls nicht durch präformierte bakterielle Faktoren induziert wird. Da bei Zugabe des Gentamicins bis 12 h nach Infektionsbeginn keine VEGF-Induktion gemessen wurde - im Gegensatz zu Versuch 3.5.3 bei Gentamicin-Zugabe nach 18 h - scheint der ungestörte Ablauf der frühen Infektion mit viablen *B. henselae* wichtig zu sein. Dieses Ergebnis würde mit den bereits gemessenen zeitlichen Verläufen der maximalen VEGF-Induktion auf mRNA (nach 6 h) und auf Proteinebene (nach 24-48 h) übereinstimmen.

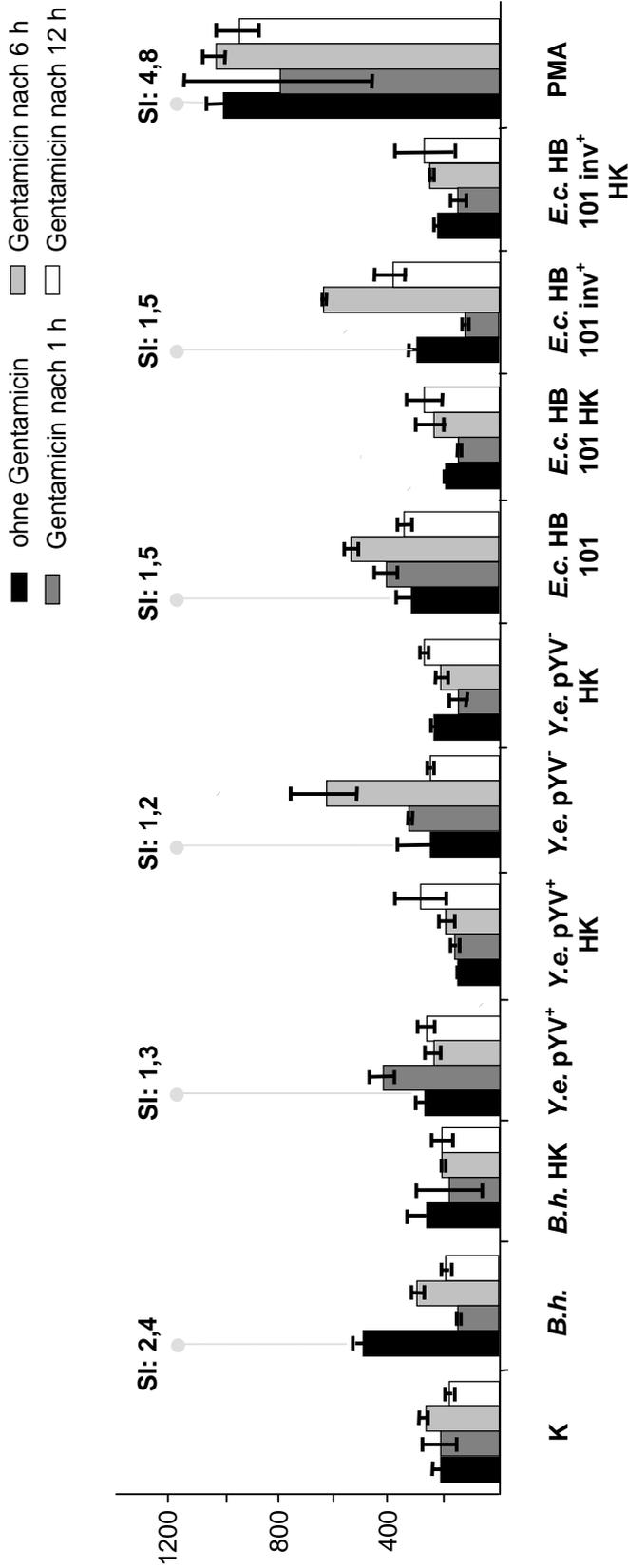


Abb.17: Gegenüberstellung der VEGF-Sekretion von HeLa 229-Zellen 48h nach Infektion mit *B. henselae*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *L. pneumophila* und *L. monozytogenes* mit und ohne Zugabe von Gentamicin nach 1h, 6h oder 12h zur Durchbrechung der Infektion. Darstellung der VEGF-Sekretion in pg/ml mittels ELISA. Mit PMA (25 ng/ml) behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle. Für die Negativkontrolle wurden nicht-infizierte Zellen verwendet. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Proben pro Gruppe dar. K: nicht-infizierte Zellen (Negativkontrolle); B.h.: mit *B. henselae*-infizierte Zellen (MOI 250); B.h. HK: mit hitzegetöteten *B. henselae*-behandelte Zellen (MOI 250); Y.e. pYV⁺: mit *Y.e. pYV*⁺-infizierte Zellen (MOI 20); Y.e. pYV⁻ HK: mit hitzegetöteten *Y.e. pYV*⁻-behandelte Zellen (MOI 20); Y.e. pYV⁻: mit *Y.e. pYV*⁻-infizierte Zellen (MOI 20); Y.e. pYV⁺ HK: mit hitzegetöteten *Y.e. pYV*⁺-behandelte Zellen; E.c. HB 101: mit *E.c. HB* 101-infizierte Zellen (MOI 100); E.c. HB 101 HK: mit hitzegetöteten *E.c. HB* 101-infizierte Zellen (MOI 100); E.c. HB 101 inv⁺: mit *E.c. HB* 101 inv⁺-infizierte Zellen (MOI 100); E.c. HB 101 inv⁺ HK: mit hitzegetöteten *E.c. HB* 101 inv⁺-behandelte Zellen (MOI 100). SI: Stimulationsindex.

3.7 Apoptoseinhibition durch *B. henselae* in Mono Mac 6-Zellen

3.7.1 Nachweis der Apoptoseinhibition mittels DNA-Laddering

Neben der Aktivierung der VEGF-Sekretion durch *B. henselae* sollten auch die antiapoptotischen Veränderungen, die durch *B. henselae* ausgelöst werden, untersucht werden. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob *B. henselae* eher die frühen oder später ablaufenden apoptotischen Prozesse beeinflusst. Es wurden Mono Mac 6-Zellen mit *B. henselae* infiziert und/oder mit dem NF- κ B-Inhibitor PDTC behandelt [Wahl *et al.*, 2001]. Um die Apoptoseinhibition nachzuweisen, sollte die bei der Apoptose typischerweise auftretende DNA-Fragmentierung mit Hilfe des *Apoptotic DNA Ladder Kits* von Roche analysiert werden. Dazu wurden Zellen ausgesät und mit *B. henselae* (MOI 100) infiziert oder mit 200 μ M PDTC behandelt. Um zu zeigen, dass *B. henselae* die Wirkung von PDTC einschränkt, wurden zusätzlich PDTC-behandelte Zellen mit *B. henselae* infiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte Zellen. Die Positivkontrolle stellten lyophilisierte, apoptotische U937-Zellen, die im Kit mitgeliefert wurden, dar. Nach einer Infektionsdauer von 24 h wurden die Zellen lysiert und die Nukleinsäuren eluiert. Die dadurch erhaltene DNA wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, wobei die DNA-Fragmentierung bei vorliegender Apoptose in Form einer „Leiter“ dargestellt wird.

Im direkten Vergleich zur Positivkontrolle zeigte sich, dass die DNA der Zellen, die nur mit PDTC behandelt wurden, deutlichen apoptotischen Veränderungen unterlag. Demgegenüber standen die mit PDTC behandelten und mit *B. henselae* infizierten Zellen, deren DNA eine weitaus geringere Fragmentierung aufwies. Außerdem konnte gezeigt werden, dass selbst gegenüber der Negativkontrolle die DNA der Zellen, die allein mit *B. henselae* infiziert wurden, einem geringeren Abbauprozess unterworfen war. Insgesamt scheint die DNA der mit *B. henselae* infizierten Zellen deutlich weniger degradiert zu sein, was für eine Apoptoseinhibition spricht (Abb. 18a).

3.7.2 Nachweis der Apoptoseinhibition mittels MTS-Assay

Parallel zu dem in 3.7.1 beschriebenen Experiment wurde ein MTS-Assay für die quantitative Analyse der Zellviabilität mitgeführt. Wiederum wurden Mono Mac 6-Zellen mit *B. henselae* infiziert und/oder mit PDTC behandelt und nach 24 h ein MTS-Assay durchgeführt. Hierbei war die Viabilität der mit PDTC behandelten Zellen deutlich erniedrigt, wohingegen bei zusätzlicher Infektion mit *B. henselae* die Zellen eine höhere Viabilitätsrate aufwiesen. Die höchste Viabilität lag wiederum bei nur mit *B. henselae* infizierten Zellen (Abb. 18b). Dieses Ergebnis korreliert mit dem des DNA-Ladderings und zeigt, dass *B. henselae* die PDTC-induzierte Apoptose in Mono Mac 6-Zellen reduziert.

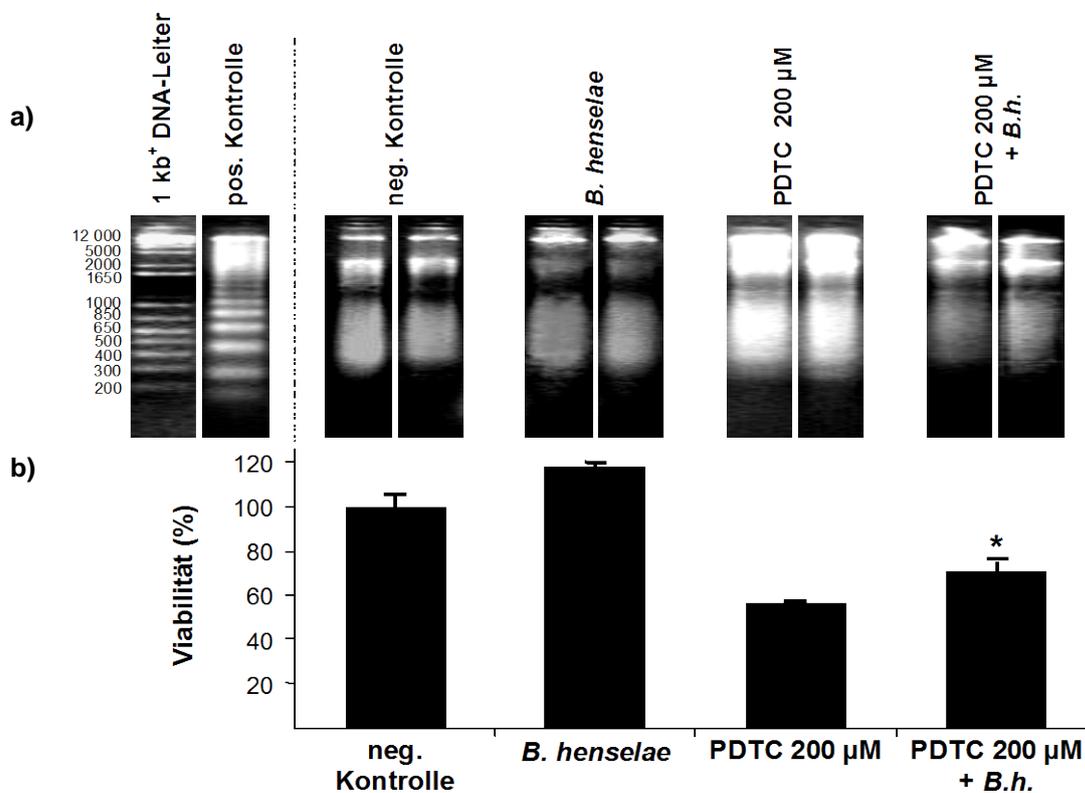


Abb. 18 a, b: Inhibition der durch PDTC induzierten Apoptose in Mono Mac 6-Zellen 24 h nach Infektion mit *B. henselae* (MOI 100). Darstellung der apoptotischen DNA in mit PDTC behandelten und mit *B. henselae* infizierten Mono Mac 6-Zellen mit Hilfe des *Apoptotic DNA Ladder Kit* von Roche (**a**). Von links nach rechts: 1 kb-DNA-Leiter, Positivkontrolle (apoptotische U937-Zellen), nicht-infizierte Zellen (Negativkontrolle), *B. henselae*-infizierte Zellen, PDTC-behandelte (200 µM) Zellen, mit PDTC behandelte und mit *B. henselae* infizierte Zellen. Viabilität in % von mit PDTC behandelten und mit *B. henselae* infizierten Mono Mac 6-Zellen, gemessen im MTS-Assay (**b**). Von links nach rechts: nicht-infizierte Zellen (Negativkontrolle), *B.henselae*-infizierte Zellen, PDTC-behandelte (200 µM) Zellen, mit PDTC behandelte und mit *B.henselae* infizierte Zellen. Die Viabilität der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. * signifikanter Unterschied zur PDTC-Gruppe mit $p < 0,05$.

3.8 Induktion der VEGF-Sekretion durch *B. henselae* in Mono Mac 6-Zellen

VEGF kann z.B. durch die Induktion von antiapoptotischen Genen (bcl-2, A1) die Apoptose hemmen [Gerber *et al.*, 1998]. Eine vorangegangene Arbeit der Arbeitsgruppe zeigt zudem, dass *B. henselae* nach einer 24-stündigen Infektion die VEGF-Sekretion von Mono Mac 6-Zellen um das 4-fache induziert. Allerdings konnte das antiapoptotische Potential nicht auf autokrine Effekte des sezernierten VEGFs zurückgeführt werden [Schairer, 2004].

Nun wurde untersucht, ob *B. henselae* schon zu einem frühen Infektionszeitpunkt die VEGF-Sekretion von Mono Mac 6-Zellen induziert. Zudem sollte mit einer Kinetik der VEGF-Sekretion im Verlauf der frühen Infektionsphase von Mono Mac 6-Zellen, die mit *B. henselae* infiziert und mit PDTC behandelt wurden, geprüft werden, ob diese Sekretion auch stattfindet, wenn die Apoptose in diesen Zellen induziert wurde. Mono Mac 6-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 100) infiziert und mit PDTC behandelt und nach 2, 6 und 12 h das sezernierte VEGF mittels VEGF-ELISA gemessen.

B. henselae-infizierte Zellen beginnen sehr früh - wenn auch zunächst nur schwach - vermehrt VEGF zu synthetisieren. Zudem sezernierten die Zellen, die mit *B. henselae* infiziert und mit PDTC behandelt wurden, ebenfalls noch signifikant mehr VEGF als die Negativkontrolle und die PDTC-Gruppe.

Obwohl PDTC als NF- κ B-Inhibitor die VEGF-Sekretion der Zellen selbst nicht beeinflussen sollte, sezernieren die *B. henselae*-infizierten und PDTC-behandelten Zellen weniger VEGF als solche, die nur mit *B. henselae* infiziert wurden - allerdings trotzdem noch mehr als die Negativkontrolle und die PDTC-Gruppe (Abb. 19). Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte dieses Ergebnis nach einer Infektionsdauer von 24 h deutlich mit einer ca. 2-fach so hohen Sekretion der mit *B. henselae* infizierten und PDTC-behandelten Mono Mac 6-Zellen im Vergleich zur Kontrolle und der PDTC-Gruppe nachgewiesen werden [Schairer, 2004]. Insgesamt kann also eine Infektion mit *B. henselae* nicht nur die Viabilität der mit PDTC behandelten MM6 erhöhen (Kapitel 3.7.2), sondern ebenfalls zu einer gesteigerten VEGF-Sekretion in diesen Zellen führen.

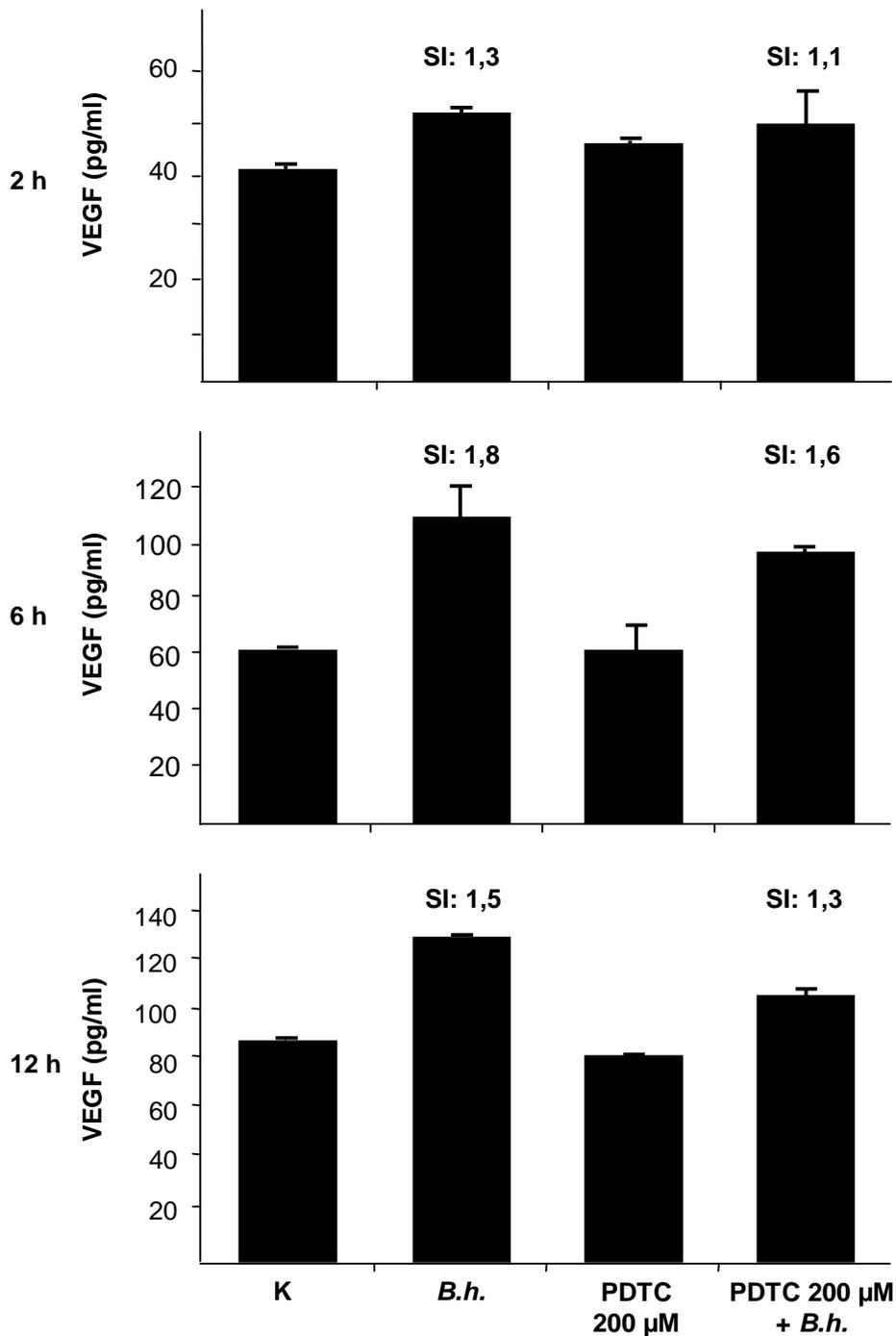


Abb. 19: VEGF-Sekretion von Mono Mac 6-Zellen 2 h, 6 h und 12 h nach Infektion mit *B. henselae*. Darstellung der VEGF-Sekretion in pg/ml mittels ELISA. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Proben pro Gruppe dar. Oben: Infektionsdauer von 2 h; Mitte: Infektionsdauer von 6 h; Unten: Infektionsdauer von 12 h. K: nicht-infizierte Zellen (Negativkontrolle); *B.h.*: *B.henselae*-infizierte Zellen (MOI 100); PDTC 200 µM: PDTC-behandelte (200 µM) Zellen; PDTC 200 µM + *B.h.*: mit PDTC (200 µM) behandelte und mit *B.henselae* infizierte Zellen (MOI 100). SI: Stimulationsindex.

3.9 Apoptoseinhibition durch *B. henselae* in HeLa 229-Zellen

Es sollte überprüft werden, ob *B. henselae* auch die induzierte Apoptose in HeLa 229-Zellen inhibieren kann. Da die Apoptoseinhibition wohl nicht ausschließlich von viablen Bakterien abzuhängen scheint, sollte auch ein möglicher antiapoptotischer Effekt hitzegetöteter *B. henselae* bzw. präformierter bakterieller Faktoren untersucht werden (siehe 3.6.1). HeLa 229-Zellen wurden daher mit viablen und hitzegetöteten *B. henselae* infiziert und/oder mit Staurosporin, einem Apoptose-Induktor, behandelt. Nach 6 h wurde die Viabilität im MTS-Assay gemessen. Wie Abb. 20 zeigt, wiesen die nur mit *B. henselae* infizierten Zellen die höchsten Werte auf. Die Viabilität von mit Staurosporin behandelten Zellen sank nach 6 h unterhalb derer der Vergleichsgruppen. Wurden HeLa 229-Zellen zusätzlich mit viablen *B. henselae* infiziert, kam es wiederum zu einer Viabilitätserhöhung. Auch die Viabilität der Zellen, die mit hitzegetöteten *B. henselae* behandelt wurden, lag oberhalb der mit Staurosporin behandelten Zellen. So inhibiert *B. henselae* die Staurosporin vermittelte Apoptose, wobei dies wohl nicht ausschließlich auf die Fähigkeit viabler *B. henselae*, sondern auch zu einem gewissen Grad auf präformierte Stoffe zurückzuführen ist.

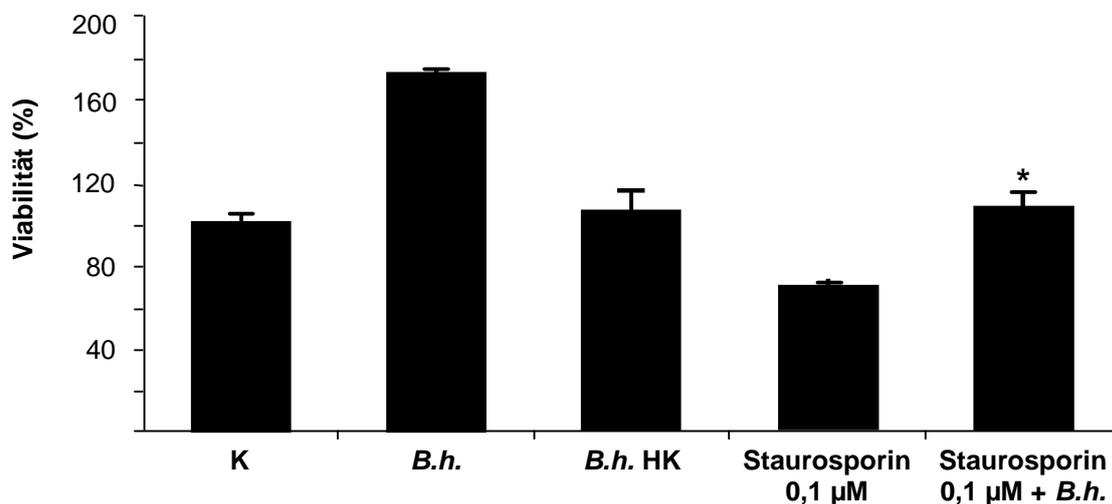


Abb. 20: Inhibition der durch Staurosporin (0,1 µM) induzierten Apoptose in HeLa 229-Zellen, 6 h nach Infektion mit *B. henselae* (MOI 500). Darstellung der Viabilität in % gemessen im MTS-Assay. Die Viabilität der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. K: uninfizierte Zellen; *B.h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen (MOI 500); *B.h.* HK: mit hitzegetöteten *B. henselae* behandelte Zellen (MOI 500); Staurosporin 0,1 µM: mit Staurosporin 0,1 µM behandelte Zellen; Staurosporin 0,1 µM + *B.h.*: mit Staurosporin 0,1 µM behandelte und mit *B. henselae* infizierte Zellen (MOI 500). * signifikanter Unterschied zur Staurosporin-Gruppe mit $p < 0,05$.

4. Diskussion

Mit Hilfe von bakteriellen Infektionen, deren klinische Manifestationen weitestgehend bekannt sind, besteht die Möglichkeit, Modelle zu errichten, die uns helfen, physiologische Regulationsmechanismen auf zellulärer Ebene zu erforschen und grundlegende Abläufe im Organismus, die zu den makroskopischen Bildern einer Erkrankung führen können, besser zu verstehen. So sind Prozesse innerhalb der Neoangiogenese, die z.B. auch das Tumorstadium regulieren, gerade im Rahmen einer Infektion mit *B. henselae* von großer Bedeutung. Nachdem früher lediglich Viren eine tumorinduzierende Eigenschaft zugesprochen wurde, wird es derzeit immer deutlicher, dass auch Bakterien diese Fähigkeit besitzen. Hier sei auf die Koinzidenz einer *H. pylori*-Infektion und dem Adenokarzinom des Magens sowie dem MALT (*mucosa associated lymphatic tissue*) - Lymphom hingewiesen [Yamasaki *et al.*, 2004]. Für eine Korrelation zwischen Tumorentstehung und bakterieller Infektion liefert eine Bartonellose allerdings genauere Hinweise. Man weiß aus histologischen Untersuchungen, dass es im Rahmen der Bazillären Angiomatose und Peliosis Hepatis zur Ausbildung von neuen kleinen Gefäßnetzen kommt, was letztendlich zu der Entstehung von gutartigen Gefäßtumoren führt. *B. henselae* aber auch andere Mitglieder der Gattung sind fähig, durch Interaktion mit Endothelzellen diese tumorähnlich zur Proliferation anzuregen. *B. henselae* liefert allerdings auch Einblicke in die Prozesse der Apoptose. Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterienarten, wie z.B. *Y. enterocolitica*, das Apoptose induzieren kann, ist *B. henselae* fähig, die Apoptose von Wirtszellen zu hemmen. Das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Angiogenese ist insbesondere auch bei der Tumorgenese von großer Wichtigkeit. So könnten durch das Verstehen bakterieller Erkrankungen - wie z.B. der Bartonellose - auch grundlegende pathophysiologische Vorgänge im Rahmen von Tumorgeschehen geklärt und neue Strategien der Tumorthherapie eröffnet werden. Diese Arbeit soll dazu beitragen, auf molekularer Ebene Abläufe der Angiogenese und Apoptose bei einer *B. henselae*-Infektion näher zu verstehen.

4.1 Pathogenität von *B. henselae* im Kontext der Angiogenese

B. henselae kann mit verschiedenen Zellarten interagieren. Zu ihnen zählen Endothelzellen, Monozyten und Epithelzellen. Jede dieser Zellarten übernimmt bestimmte Funktionen im Rahmen einer bakteriellen Infektion, wobei im Verlauf der resultierenden Immunantwort auch Interaktionen zwischen den einzelnen Zelltypen zu beobachten sind. So besitzen Epithelzellen als „mechanische Barriere“ eine Hauptschutzfunktion. Sie sind fähig, bei Kontakt mit Pathogenen eine Immunantwort im Organismus auszulösen, indem z.B. proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden. Endothelzellen schützen nicht nur die Gefäßwände, sondern vermitteln darüber hinaus den Stoffaustausch und die Signalübertragung. Makrophagen und Monozyten sind für die angeborene Immunität sehr wichtig. Man weiß, dass diese Zellen durch Sekretion proangiogenetischer Zytokine, wie z.B. VEGF, IL-8 und andere, die Angiogenese anregen, um so das entsprechende Gebiet durch erhöhte Permeabilität und durch vermehrte Durchblutung besser infiltrieren zu können. Dies nutzen z.B. Bakterien, wie *Yersinia* spp. aus. Durch Invasion von spezialisierten „membranösen Zellen“ (M-Zellen) gelangen sie in tiefere Gewebeschichten. Die durch die ausgelöste Entzündung angelocktem aktivierten Abwehrzellen durchbrechen die Epithelzellschicht durch Infiltration und erhöhen zudem die Gewebeporosität. Nach Adhäsion an Makrophagen und Injektion bakterieller Proteine lösen *Yersinia* spp. aber Apoptose in Makrophagen aus. Durch die fortschreitende ungebremste Entzündung kommt es so im weiteren Verlauf der Erkrankung zur Zerstörung der Peyer'schen Plaques und zur Streuung der Bakterien im Organismus [Grützkau *et al.*, 1990; Autenrieth und Firsching, 1996].

Auch bei einer Infektion mit *B. henselae* ist anzunehmen, dass das Bakterium durch gezielte Stimulation und Inhibition die Immunabwehr des Wirtes umgeht („*immunevasion*“). Aus diesem Grund wurden Zellkultur-experimente durchgeführt, die es erlauben sollten, Vergleiche in Bezug auf die Zytokin- bzw. auf die VEGF-Sekretion anzustellen. Hierdurch erhoffte man sich letztlich tiefere Einblicke in die Induktion von Angiogenese und Inhibition der Apoptose durch *B. henselae* zu erhalten.

4.1.1 VEGF als Mediator vaskuloproliferativer Erkrankungen

Der Wachstumsfaktor VEGF spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der pathologischen Neoangiogenese [Yancopoulos *et al.*, 2000; Ferrara, 2001]. Es gibt Hypothesen, dass die durch *B. henselae* induzierte Vaskuloproliferation sowohl auf proangiogenetische als auch auf antiapoptotische Zytokine zurückzuführen ist [Kirby und Nekorchuk, 2002]. Da VEGF in Biopsien der BA und PH erhöht zu finden ist und *B. henselae* *in vitro* HUVEC über VEGF zur Proliferation anregen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Faktor um VEGF handeln könnte [Kempf *et al.*, 2001a]. Parallelen dazu finden sich bei der Infektion mit dem humanen Herpesvirus-8, dem Erreger des HIV-assoziierten Kaposi-Syndroms. HHV-8 induzieren zunächst die VEGF-Sekretion, was in einer Proliferation der EZ resultiert. Da sich die Viren aber auch in EZ replizieren, liefert diese Strategie Vorteile für das Virus [Masood, 1997; Panyutich, 1998]. Insgesamt gibt es aber bis heute keinen Nachweis, dass die VEGF-Induktion mit anschließender Vaskuloproliferation bei einer bakteriellen Infektion üblich ist.

Mit mRNA-Analysen wurde gezeigt, dass es bei der Infektion von Epithelzellen (HeLa 229-Zellen), Monozyten (Mono Mac 6-Zellen), EZ (HUVE-Zellen) und EA.hy 926-Zellen mit *B. henselae* zu einer höheren VEGF-Transkription kommt (Kapitel 3.1). Die Stärke der Induktion war sowohl vom Zelltyp, der Infektionsdauer als auch von der Bakterienzahl abhängig. Es wurde nachgewiesen, dass HeLa 229-Zellen alle 4 VEGF Isotypen exprimieren. In HUVEC überwiegt hingegen die Induktion der kurzen löslichen VEGF-Isoform VEGF₁₂₁. Die VEGF-mRNA-Induktion in Mono Mac 6-Zellen ähnelte derer von HeLa 229-Zellen, wobei auch hier die kurzen löslichen VEGF-Varianten stärker induziert wurden. In EA.hy 926-Zellen konnte nur die vermehrte Expression von VEGF₁₆₅ nachgewiesen werden. Insgesamt deutet viel darauf hin, dass *B. henselae* insbesondere die freien löslichen VEGF-A-Isotypen induziert. Dies würde sicherstellen, dass es zu einer ausreichenden und schnellen VEGF-induzierten Angiogenese kommen kann (siehe Abb. 4, 7-10) [Ferrara, 2004].

Mit einer zeitlichen Verzögerung von 24 h wurde zudem VEGF mittels ELISA im Zellkulturüberstand von infizierten HeLa 229-Zellen nachgewiesen. Dass auch Mono Mac 6-Zellen unter Stimulation mit *B. henselae* zu einer vermehrten Sekretion von VEGF in der Lage sind, zeigt die Abb. 19. Insgesamt können nach einer zeitlichen Verzögerung von 20 bis 70 h nach der maximalen Induktion auf mRNA-Ebene, abhängig von der Zellart, die untersuchten Zelllinien das Protein VEGF maximal sezernieren.

Verglichen mit Mono Mac 6-, EA.hy 926- und HeLa 229-Zellen, fiel die Menge an VEGF, die von HUVE-Zellen sezerniert wurden, deutlich geringer aus. Allerdings stammen HeLa 229- und EA.hy 926-Zellen von Tumorzellen ab (Zervix- bzw. Lungenkarzinom). Von Tumorzellen ist bekannt, dass sie u.a. mittels VEGF - in Bezug auf dessen Produktion sie äußerst potent sind - die Tumorangio-genese einleiten können. Im Rahmen der Tumorgenese sind es nicht die EZ, die VEGF verstärkt sezernieren, sondern vielmehr die Tumorzellen selbst, während die mit dem Tumor assoziierten Gefäßendothelien vermehrt VEGF-Rezeptoren exprimieren. VEGF stimuliert EZ wiederum ein neues Gefäßnetz auszubilden, wobei sie in Richtung des Stimulus, den die Tumorzellen darstellen, sprossen. Es ist also denkbar, dass die vom Zelltyp abhängige, durch *B. henselae* stimulierte VEGF-Sekretion sich ähnlich zu der Tumorangio-genese verhält [Siemeister *et al.*, 1998b; Yancopoulos *et al.*, 2000].

Entsprechend wurde gezeigt, dass es nach der Infektion auch zur mRNA-Induktion des VEGFR-2 (KDR) in EZ kommt [Kempf *et al.*, 2005a]. Bei Aktivierung durch VEGF induziert dieser in HUVEC u.a. Angiogenese, Chemotaxis, antiapoptotische Effekte und steigert zudem die Permeabilität sowie die Mitogenität. In diesem Zusammenhang würde auch die Induktion der verschiedenen Isotypen in unterschiedlicher Stärke stehen. So wären gerade die löslichen Isoformen VEGF_{165, 121} wichtig, da diese ein höheres angiogenes Potential aufweisen als die membranständigen Formen VEGF_{189, 206} [Ferrara, 2004].

Obwohl EZ für *B. henselae* Zielzellen darstellen, werden auch andere Zellen, wie z.B. Erythrozyten, Epithelzellen und Monozyten infiziert [Batterman *et al.*, 1995; Kordick und Breitschwerdt, 1995]. Es wurde gezeigt, dass letztere nach Infektion mit *B. henselae* ebenfalls vermehrt VEGF sezernieren. Mit der

Strategie schnell eine starke VEGF-Sekretion in „Sekundärzellen“ zu induzieren, könnte *B. henselae* sicherstellen, dass die EZ, in denen es sich vor der Immunantwort des Organismus „versteckt“, derart zur Proliferation angeregt werden, dass seine „intrazelluläre Lebensgrundlage“ vergrößert wird.

Die Funktionen von VEGF sind sehr vielfältig und bisher ist noch unklar, welche genau bei der *B. henselae*-Infektion eine Rolle spielen. VEGF stimuliert die Expression von VCAM-1 und ICAM-1(CD 54). Diese Adhäsionsmoleküle werden auch bei der Infektion von HUVEC mit *B. henselae* induziert und sind für die Tumorangio-genese und -progression von großer Bedeutung. Sie können mit anderen Molekülen (CD-18; VLA-4) auf der Zelloberfläche von NK-Zellen interagieren und die Adhäsion an EZ fördern [Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Ding *et al.*, 2003]. Bei der *B. henselae*-Infektion wird zudem durch die ICAM-1-Induktion eine vermehrte Adhäsion von polymorphkernigen Neutrophilen provoziert [Colotta *et al.*, 1992; Fuhrmann *et al.*, 2001]. Allerdings gibt es bis heute keine Daten darüber, ob die Expression dieser Moleküle mit der VEGF-Induktion durch *B. henselae* zusammenhängt oder unabhängig davon verläuft.

Des Weiteren mildert VEGF die durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierte Apoptose in HUVEC ab. Diese Zellwandbestandteile stellen zugleich wichtige Pathogenitätsfaktoren gramnegativer Bakterien dar. In EZ können sie u.a. durch Aktivierung der Caspasen 1 und 3 sowie der Spaltung von FAK (*focal adhesion kinase*) aber auch durch Erhöhung der proapoptotischen Moleküle Bax und p53 zur Apoptose führen. Im Rahmen der EZ-Apoptose wird vermutet, dass das *tumor suppressor gene* p53 transkriptionell Bax und Caspase 1 aktiviert und die Translokation von Bax in Richtung Mitochondrium triggert, was zur Freisetzung von Cytochrom C führt. Nun wurde gezeigt, dass bei Vorbehandlung der EZ mit VEGF, die durch LPS ausgelöste p53- und Bax-Induktion sowie Caspasen 3-Aktivierung inhibiert werden und FAK aktiviert wird, das vermutlich die p53-vermittelte Apoptose antagonisiert [Munshi *et al.*, 2002]. *B. henselae* verfügt ebenfalls über schwach toxische LPS, was zur Aktivierung des Komplementsystems führen kann [Rodriguez-Barradas *et al.*, 1995; Zähringer *et al.*, 2004]. Das LPS scheint zudem die Aktivierung von Zytokinen zu beeinflussen. So wurde z.B. in Makrophagen die Aktivierung von HIF-1 beobachtet [Blouin *et al.*, 2004].

Die Abb. 21 zeigt verschiedene Regulationsmechanismen von VEGF auf molekularer Ebene. Einige von ihnen konnten auch im Rahmen der *B. henselae* Infektion aufgezeigt werden. Allerdings ist noch unklar, welche Prozesse durch das Bakterium selbst, durch VEGF oder durch andere bisher noch unbekannte Faktoren ausgelöst werden.

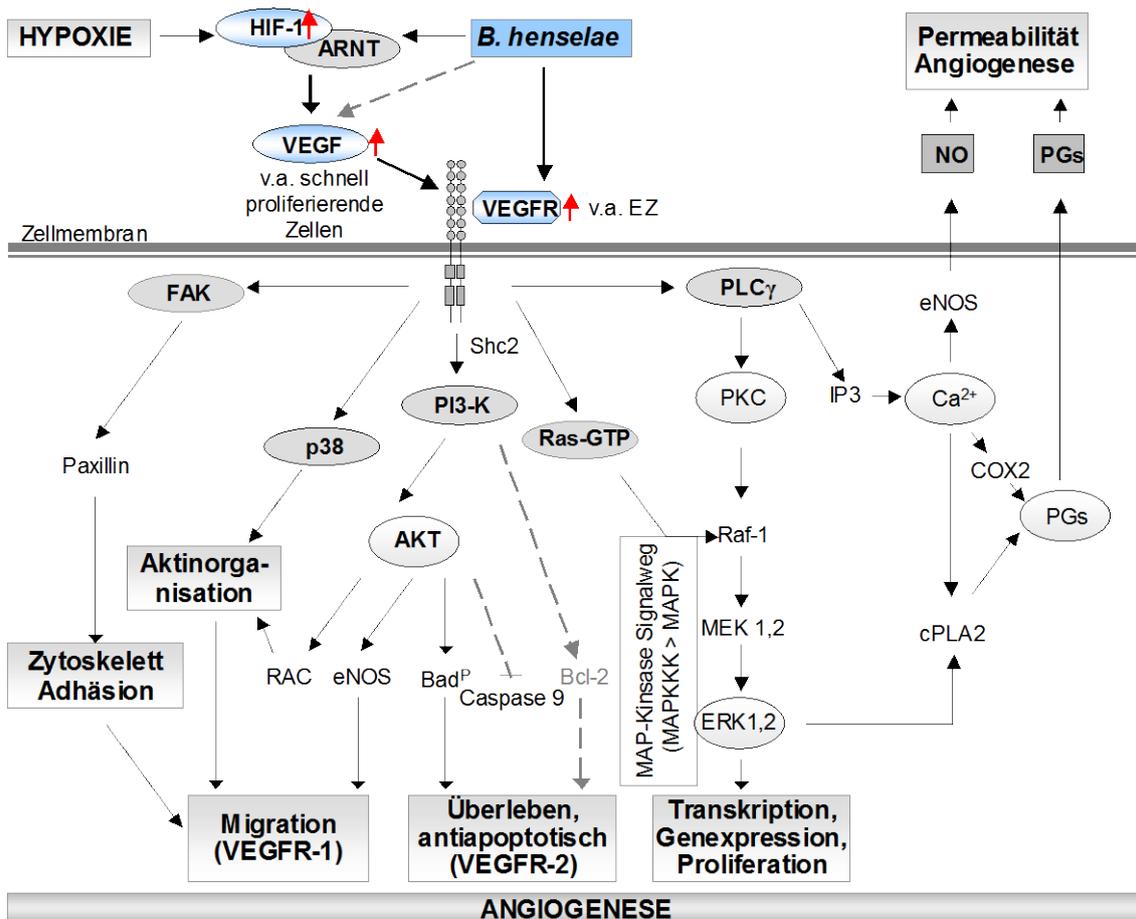


Abb. 21: Mögliche Signaltransduktion durch VEGF unter dem Aspekt der Angiogeneseinduktion nach der Infektion mit *B. henselae*. Für die Pathogenität von *B. henselae* sind Mechanismen, wie Adhäsion, Aktin-Arrangement und natürlich vermehrte Migration, Genexpression sowie Proliferation von bzw. in Zielzellen enorm von Bedeutung. VEGF führt über verschiedene Signalwege in den jeweiligen Zellen zu diesen Effekten. Zudem wirkt es in einigen Zellen auch antiapoptotisch. Auch wenn VEGF bei der *B. henselae*-Infektion nicht als einziges angiogen und antiapoptotisch wirksames Zytokin in Betracht kommt, sollen hier die möglichen *pathways* gezeigt werden, die durch die von *B. henselae* induzierte VEGF-Sekretion in infizierten Zellen resultieren können. Da aber auch andere Zytokine bereits identifiziert wurden, die solche Prozesse regulieren, soll hier auf mögliche synergistische Effekte und auf die Bedeutung der VEGF-Induktion und dessen Potential für die Pathogenität von *B. henselae* hingewiesen werden. Nach: Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Zachary, 2003; Dehio, 2004; Ferrara, 2004; Kempf *et al.*, 2005a.

EZ, die mit konditioniertem Medium aus mit *B. henselae* infizierten Zellkulturen behandelt wurden, wiesen eine erhöhte Proliferation und Viabilität auf. Allerdings kam es nach der Zugabe von VEGF-Antikörper nicht zur vermuteten vollständigen Remission dieser Effekte. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass der antiapoptotische Effekt bei einer *B. henselae*-Infektion in Mono Mac 6-Zellen nicht allein auf VEGF zurückzuführen ist [Schairer, 2004]. Dies schließt allerdings nicht aus, dass das hochregulierte VEGF in anderen Zellen antiapoptotisch wirkt, was in einem folgendem Kapitel diskutiert werden soll (Kap.4.2.2). Vielmehr kann es sich um einen Pathomechanismus von *B. henselae* handeln, wobei gezielt ein „*paracrine angiogenetic loop*“ eingeleitet wird und neben VEGF noch weitere proangiogenetische Zytokine induziert werden. Hierbei könnten diverse Zellarten so zur Interaktion stimuliert werden, dass *B. henselae* letztlich seine Pathogenität steigern bzw. sein Überleben sichern kann.

Abschließend sei auf das große Potential von angio- und mitogenen Molekülen im Rahmen der Tumorthherapie hinzuweisen. So hat auch VEGF in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen. Für viele Karzinome ist eine gute Durchblutung und damit ein ausreichendes Gefäßnetz essentiell für das weitere Wachstum. VEGF zählt dabei zu den zentralen Mediatoren der Tumorangiogenese [Dvorak et al., 1995; Ferrara, 2004]. Inzwischen konnte entsprechend eine erhöhte VEGF-mRNA Expression in diversen Tumorzellen, wie u.a. beim Lungenkarzinom, Mammakarzinom, bei Tumoren des Endometriums, des Gastrointestinaltraktes, der Niere aber auch in Hirntumoren, wie bei dem *Glioblastoma multiforme* nachgewiesen werden [Benjamin et al., 1999; Ferrara, 2004]. Im weiteren Verlauf konnte man durch den Einsatz von VEGF-spezifischen Antikörpern zeigen, dass eine VEGF-Repression im Mausmodell zu einer Inhibition des Wachstums von Leiomyosarkom-, Rhabdomyosarkomzellen und Glioblastomzellen führt [Kim et al., 1993]. Später wurde gezeigt, dass auch VEGFR-2-Ak zur Reduktion des Tumorwachstums führen können. Inzwischen wurde in klinischen Studien demonstriert, dass die Behandlung mit anti-VEGF-Antikörpern zusätzlich zur Chemo- und Strahlentherapie eine durchaus wirksame Ergänzung darstellt [Ferrara, 2004, Klement et al., 2000]. Die resultierende Tumormassenreduktion war dabei letztendlich auf die Unterver-

sorgung - „ein Aushungern“ - des Tumors zurückzuführen. Vor ein paar Jahren wurde Bevacizumab - ein anti-VEGF-Antikörper - entwickelt, der zunächst erfolgreich bei der Behandlung des Mamma- und des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wurde. Nun zeichnet sich in Phase-III-Studien ab, dass die Kombination von Bevacizumab mit der Chemotherapie ebenfalls signifikant zur Erhöhung des durchschnittlichen Gesamtüberlebens in der Therapie des metastasierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) führt [Ferrara und Alitalo, 1999; Ferrara, 2004; Ferrara *et al.*, 2004]. Mit dem Wissen über die Korrelation von Angiogenese und Tumorwachstum auf molekularbiologischer Ebene können so auch Ansätze für neue Schemata in der Tumorthherapie eröffnet werden.

4.1.2 Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort nach Infektion mit *B. henselae* in HeLa 229- und HUVE-Zellen

Die Antwort von Zellen auf diverse extra- und intrazelluläre Signale wird durch ein An- und Abschalten bestimmter Gene bzw. durch das Ausmaß ihrer Transkription moduliert. Dieses An- und Ausschalten innerhalb einer Signalkaskade wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert.

Insbesondere die VEGF- und die IL-8-Induktion spielen bei der Infektion mit *B. henselae* eine wichtige Rolle. Allerdings kann VEGF nicht alleine die Angiogenese steuern. Wie klinische Studien zeigten, bildeten sich nach alleiniger Gabe von VEGF bei ischämischen Erkrankungen, anstatt neuer Kollateralgefäße, instabile und mit Ödemen assoziierte Gefäße aus [Ferrara und Alitalo 1999]. So entstand die Theorie über einen sogenannten „angiogenetischen Cocktail“, der für die mit *B. henselae* assoziierten Veränderungen in den Gefäßendothelien ursächlich ist [Kempf *et al.* 2001a]. Um zu überprüfen, ob *B. henselae* gezielt ein genetisches Programm in der Wirtszelle induziert, sollte deshalb in der vorliegenden Arbeit ein Profil der Genexpression nach einer Infektion mit *B. henselae* in Endothel- und Epithelzellen erstellt werden.

Bei der Infektion von HeLa 229-Zellen ergab sich auf Transkriptionsebene ein stark angiogen geprägtes Bild. So werden die meisten der hochregulierten Gene (ADM, EFNA-1, VEGF, IGFBP-3, ET-2, NDRG1, STC-2, CCNG2, ENO2, SLC2A3, HK2, NFIL3, PAK, FLJ20500) bekanntermaßen direkt oder

indirekt durch Hypoxie und HIF-1 reguliert. Allerdings konnte mit IL-8 nur ein einziges Gen gefunden werden, das durch NF- κ B reguliert wird. Sechs dieser Gene (IL-8, ADM, EFNA-1, VEGF, IGFBP-3, ET-2) werden angioproliferative Eigenschaften zugeschrieben [Leung *et al.*, 1989; Koch *et al.*, 1992; Pandey *et al.*, 1995; Yancopoulos *et al.*, 1998; Kahn *et al.*, 2000; Semenza, 2001; Marvin *et al.*, 2002; Öhler *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2003].

IL-8 wirkt ebenfalls angiogenetisch und ist in Prozesse wie die EZ-Proliferation, dem Zytoskelettaufbau und dem EZM-Abbau während der Kapillarentwicklung involviert. Darüber hinaus hat man IL-8 in Karzinomen erhöht vorgefunden [Koch *et al.*, 1992; Yoshida *et al.*, 1997; Brat *et al.*, 2005]. Auch das induzierte Adrenomedullin wird in Tumorzellen bei Hypoxie vermehrt gebildet und trägt zum Tumorwachstum bei. Es spielt weiterhin bei Prozessen der Vasodilatation, Angiogenese und Inflammation eine Rolle [Kitamura *et al.*, 1993]. Auch das fast 4-fach induzierte Ephrin A-1 und das Endothelin-2 stehen in engem Zusammenhang mit Angiogenese und tumorösen Geschehen [Ogawa *et al.*, 2000; Öhler *et al.*, 2002; Grimshaw *et al.*, 2004]. Zudem zeigten Untersuchungen, dass im Mausmodell EZ des Mammakarzinoms vermehrt IGFBP-3 bilden [Schmid *et al.*, 2003]. Neben dem Einfluss auf die Signaltransduktion wurde das hypoxieabhängige STC2 ebenfalls im Mammakarzinom vermehrt gefunden [Chang *et al.*, 2003]. KIAA0742 besitzt einige Homologien zum *open reading frame 48* von HHV8, was innerhalb der Angiogenese von Bedeutung sein könnte [Nakamura *et al.*, 1988]. Insgesamt könnten somit auch Parallelitäten zwischen der Tumorangiogenese und einer *B. henselae*-Infektion angenommen werden.

Intrazelluläre Bakterien greifen oftmals auf den Stoffwechsel der Zielzelle zu und können ihn teilweise gezielt beeinflussen. Dies erhöht aber den Energiebedarf der Zelle um so mehr. Mit Hilfe der Induktion von Angiogenese und der Aktivierung von Schlüsselgenen innerhalb der Glykolyse (HK2, ENO2, SLCA3) könnte *B. henselae* das Sauerstoffangebot, aber auch den Energiestoffwechsel der Zellen erhöhen [Semenza *et al.*, 2001; Arora *et al.*, 1990]. Nicht zuletzt erfüllen einige der verbleibenden vermehrt exprimierten Gene auch Funktionen im Verlauf des Zellzyklus' und der Signaltransduktion.

Im Gegensatz dazu zeigte das Expressionsprofil infizierter HUVEC vermehrt Gene, die für die Regulation von Inflammation und Karzinogenese von Bedeutung sind. Neben den HIF-1-regulierten Genen, wie VEGF, ANGPTL4, SLC2A3 bzw. GLUT3 und ADM wurden auch diverse NF- κ B-regulierte Gene gefunden (IL-8, CSF2, MCP-1, CXCL1,2,3, SELE, ICAM1, TNF-AIP3, COX2, IL-6, BCL3 und VCAM1). Wie bereits erwähnt, wirkt IL-8 angiogenetisch und kann in HUVEC Chemotaxis und Proliferation stimulieren, aber auch Apoptose inhibieren [Koch *et al.*, 1992]. Hierbei ist insbesondere die Regulierung von Bax und Bcl-2 von großem Interesse. Diese Moleküle zählen zur Bcl-2-Familie, deren Vertreter sowohl proapoptotisch (z.B. Bax) als auch antiapoptotisch (z.B. Bcl-2) wirken können. Bax induziert die Freilassung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium, was im weiteren Verlauf die Apoptose vorantreibt. Bcl-2 hingegen ist fähig, diese Ausschüttung zu unterdrücken [Kuwana und Newmeyer, 2003]. Nun wurde gezeigt, dass es nach Infektion von HUVEC mit *B. henselae* zu einer IL-8-abhängigen Induktion von Bcl-2 kommt, wohingegen Bax herabreguliert wurde. Abgesehen davon konnte auch die Hochregulation der IL-8-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 beobachtet werden [McCord *et al.*, 2006].

Im durchgeführten Genchipexperiment fand sich zudem eine Induktion der Chemokine MCP-1 und GRO-1. Aplin *et al.* zeigten 2006, dass diese auch in Aortapräparaten nach Behandlung mit VEGF induziert werden. Allerdings konnten sie nachweisen, dass solche Zytokine allein die Angiogenese nicht einleiten können. Dass VEGF außerdem nur in geringer Menge von HUVEC gebildet wird, deutet wieder auf synergistische Effekte eines „angiogenetischen Cocktails“ hin, der letztendlich zur Zellproliferation führt [Dehio *et al.*, 2005].

In diesem Kontext darf nicht vernachlässigt werden, dass verschiedene Zelltypen von der *B. henselae*-Infektion betroffen sein können und einige von ihnen zu einer starken VEGF-Sekretion angeregt werden können. In HUVEC z.B. werden durch die Infektion diverse Zytokine induziert, die in Folge gerade solche Zellen anziehen. So wirkt z.B. MCP-1 stark chemotaktisch auf Monozyten und erhöht deren Adhärenz am Gefäßendothel, was in der Folge zu einer Entzündungsreaktion am Gefäß führen kann [Li *et al.*, 2003]. Dies und auch die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass neben EZ auch Monozyten bei

einer *B. henselae*-Infektion eine Rolle spielen. Dafür spricht auch die Hochregulation von GM-CSF, von dem man weiß, dass es das Überleben von in der Kultur sonst eher kurzlebigen polymorphkernigen Neutrophilen erhöht [Colotta *et al.*, 1992]. In diesem Kontext steht ebenfalls auch die nachgewiesene Induktion der Selektine und Integrine (VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin). Bei VCAM-1 und ICAM-1 handelt sich um Zelloberflächenglykoproteine, die für die Zellinteraktion und -differenzierung von Bedeutung sind. VCAM-1 ist zudem für die Tumorangio-genese (z.B. Magenkarzinom) wichtig. Es wird angenommen, dass es die Adhärenz von Tumorzellen am Gefäßendothel triggert und so erste Schritte bei der Tumormetastasierung reguliert [Ding *et al.*, 2003]. Die durch NF- κ B regulierten Adhäsionsmoleküle ICAM -1 und E-Selektin sind im Verlauf einer akuten Entzündungsreaktion bedeutsam. Sie werden nicht nur durch *B. henselae* selbst, sondern auch durch dessen aufgereinigte OMPs induziert und führen bereits in der frühen Phase der *B. henselae*-Infektion zur Aktivierung der EZ [Fuhrmann *et al.*, 2001]. E-Selektin scheint zudem bei der Tumorgenese mitzuwirken. So wurde demonstriert, dass Leukämiezellen E-Selektin zur Orientierung nutzen und es zu einer verringerten Besiedlung von endothelialen Mikrodomänen bei Fehlen von E-Selektin kommt [Sipkins *et al.*, 2005].

Das induzierte JunB ist ein durch NF- κ B regulierter Transkriptionsfaktor, der fähig ist, VEGF direkt zu regulieren. Krebszellen, die z.B. über kein JunB verfügen, wachsen deutlich langsamer, produzieren nur sehr wenig VEGF und bilden letztendlich weniger und kleinere Gefäße aus [Schmidt *et al.*, 2007]. So könnte neben HIF-1 und NF- κ B auch JunB ebenfalls eine wichtige Rolle zur Sicherung der VEGF-Induktion bzw. bei der *B. henselae*-Infektion spielen.

Die voneinander abweichenden Daten der Array-Experimente mit HUVE- und HeLa 229-Zellen deuten an, dass eine *B. henselae*-Infektion in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich abläuft und durch diverse Strategien des Bakteriums eventuell synergistische Effekte zwischen Zellen ausgelöst werden können. So wären durch die akute Entzündungsreaktion angelockte Monozyten potent in Bezug auf die VEGF-Sekretion, was dann wiederum zu einer Proliferation von HUVE-Zellen führt. Darüber hinaus wird deutlich, wie sehr das Bild einer *B. henselae*-Infektion der Tumorangio-genese ähnelt.

4.1.3 Die Rolle von HIF-1 im Rahmen einer Infektion mit *B. henselae*

Die Genexpressionsanalysen zeigen, dass HIF-1 eine entscheidende Rolle innerhalb der *B. henselae*-Infektion spielt. Neben dem Einfluss auf die Glykolyse und die Erythropoese ist dieser Transkriptionsfaktor insbesondere für die Angiogenese und Tumorgenese von großer Bedeutung [Tang *et al.*, 2004a; Tang *et al.*, 2004b]. So wurde bereits in diversen Neoplasien eine HIF-1-Aktivierung mit gesteigerter Angiogenese nachgewiesen [Wiesener *et al.*, 2001]. Es gibt zudem Anhaltspunkte dafür, dass HIF-1 α auch den ATP-Spiegel der EZ bei Hypoxie aufrecht erhält [Tang *et al.*, 2004b]. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte auf verschiedenen Wegen gezeigt werden, dass es in HeLa 229- und HUVE-Zellen nach 3-6 h zu einer maximalen HIF-1 α -Aktivierung kommt [Kempf *et al.*, 2005a]. Dies wurde indirekt auch durch die Aktivierung verschiedener HIF-1-regulierter Proteine, wie VEGF, bestätigt, die mit einer vom Zelltyp abhängigen zeitlichen Verzögerung von 24-72 h nach Infektion feststellbar waren.

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde weiterhin nachgewiesen, dass in HUVEC neben HIF-1 auch HIF-2 aktiviert wird. Dieser dem HIF-1 verwandte Faktor spielt ebenfalls eine Rolle in der Angiogenese und im Verlauf von Tumorgeschehen. Außerdem ist interessant, dass HIF-1 die Expression von VEGFR-1 (flt-1) und HIF-2 die Expression von VEGFR-2 (KDR) verstärkt [Gerber *et al.*, 1997; Josko und Mazurek, 2004]. Es deutet also viel darauf hin, dass eine *B. henselae*-Infektion ähnliche Prozesse induziert, wie dies im Rahmen der Tumorgenese der Fall ist. Zusammenfassend scheint es, dass *B. henselae* in verschiedensten Zellarten unterschiedlichste Regulationsmechanismen induziert und die Zellen somit derart moduliert werden, dass für das Bakterium gute Lebensgrundlagen resultieren.

4.2 Pathogenität von *B. henselae* im Kontext der Apoptose

Die Apoptose von Zellen kann für den Infektionsverlauf entscheidend sein. Daher stellt die Modulation der Apoptose für viele extra- und intrazelluläre Bakterien eine wichtige Pathogenitätsstrategie dar. Insbesondere Zellen der Immunabwehr sind dabei ein Angriffsziel, da die eingeleitete Apoptose z.B. extrazellulären Bakterien die Möglichkeit bietet, der Immunabwehr zu entgehen.

Y. enterocolitica induziert z.B. durch Hemmung von NF- κ B Apoptose in Makrophagen. [Ruckdeschel *et al.*, 1998; Ruckdeschel *et al.*, 2001]. Auch *Shigella flexneri* und *Salmonella* spp. (*S. enterica* und *S. typhimurium*) sind fähig, Apoptose zu verursachen, indem sie Proteine über ihr TIIISS in Makrophagen einschleusen und in Folge Toxin-getriggert die Caspase 1 aktivieren. Dieser Mechanismus erlaubt ihnen, leichter bakterizide Makrophagen und Lymphozyten zu zerstören [Zychlinsky *et al.*, 1992; Monack *et al.*, 1996; Hilbi *et al.*, 1998; Hersh *et al.*, 1999; Navarre und Zychlinsky, 2000]. Von anderen gramnegativen Bakterien, wie *S. aureus*, *N. gonorrhoeae* sowie Hämolyysin-bildenden *E. coli*-Stämmen ist bekannt, dass sie über Poren-formende Toxine (z.B. das α -Toxin von *S. aureus* oder das PorB von *N. gonorrhoeae*) verfügen [Jonas *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1999]. Damit können die Erreger die Zellmembran destabilisieren und Zellen invadieren. Neben dem Ca^{2+} -Einstrom ins Zytoplasma wird zudem aus dem Mitochondrium Cytochrom C freigesetzt, was in einer Caspasen-abhängigen Apoptose resultiert [Muller *et al.*, 1999; Neumeister *et al.*, 2002]. Andere Bakterien wiederum (*P. aeruginosa*, *H. pylori* und *S. aureus*) können durch Hochregulierung oder vermehrte Freisetzung des proapoptotischen CD95 oder durch das Supprimieren von antiapoptotischen Genen, wie dem Bcl-2 (Mykobakterien) Apoptose induzieren [Klingler *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000; Baran *et al.*, 2001; Jendrossek *et al.*, 2001].

Aber auch um nach erfolgreicher Replikation aus den Zellen wieder freigelassen zu werden und um weitere Zellen infizieren zu können, induzieren Bakterien gezielt Apoptose. Hierbei würden allerdings intrazellulär lebende Bakterien zunächst ihren Lebensraum verlieren und wären dann auch der Immunabwehr des Organismus ausgesetzt, was ebenfalls eine Limitation der Infektion bedeuten könnte. Um diesen Effekt zu umgehen, haben speziell einige intrazelluläre Bakterien Mechanismen entwickelt, die es ihnen erlauben, die Apoptose in Zielzellen zu inhibieren [Sukumaran *et al.*, 2004]. Zu solchen Bakterien zählen *M. tuberculosis*, *C. pneumoniae*, *B. suis* und *R. rickettsii* [Clifton *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 2000; Durrbaum-Landmann *et al.*, 1996; Airene *et al.*, 2002]. Zu ihnen gehört auch das fakultativ intrazellulär lebende Bakterium *B. henselae* [Anderson und Neumann, 1997].

4.2.1 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B und seine Rolle in der Apoptose

NF- κ B besitzt vielfältige Funktionen, wie z.B. innerhalb der Embryonalentwicklung und der angeborenen sowie der erlernten Immunität. NF- κ B ist an I κ B im Zytosol gebunden und wird z.B. nach Aktivierung vom TNF- α und LPS (z.B. durch Bindung an den TLR4/CD14-Komplex) von I κ B abgespalten und freigesetzt. NF- κ B wandert dann zum Zellkern, wo es z.B. Zytokine reguliert. NF- κ B kann sowohl antiapoptotisch als auch proinflammatorisch wirken und wird u.a. durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Stress aktiviert. Zu den Genen, deren Promotorregionen sensibel auf NF- κ B reagieren, zählen Zytokine (z.B. IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , β), Adhäsionsmoleküle (z.B. VCAM-1, ICAM-1) und andere Vertreter der NF- κ B/Rel-Familie und I κ B-Familie (z.B. p53, c-Myc, Ras) [Koong *et al.*, 1994; Faure *et al.*, 2001; Klumpp *et al.*, 2001].

Bei der *B. henselae*-Infektion von HeLa 229-Zellen werden sowohl HIF-1-gesteuerte als auch das NF- κ B-regulierte Gen IL-8 induziert. In HUVE-Zellen führte die Infektion mit *B. henselae* zur Induktion verschiedener NF- κ B-regulierter Gene, die zum Teil proangiogenetisch wirken, aber auch für Inflammation und Apoptose von Bedeutung sind (u.a. GM-CSF, MCP-1, ICAM-1, SELE, IL-8) [Karin und Lin, 2002]. Es gibt Hinweise, dass das VirB-TIVSS von *B. henselae* nicht nur für die Internalisierung der Bartonellen wichtig ist, sondern zu einer NF- κ B-Aktivierung mit anschließender NF- κ B-vermittelter proinflammatorischer Aktivierung von Chemokinen sowie zur Apoptoseinhibition führt. So werden bei der Infektion mit hoher Bakterienzahl sogar zytostatische und zytotoxische Effekte beobachtet [Schmid *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2004b]. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass bei der *B. henselae*-Infektion von HeLa 229-Zellen, abgesehen von HIF-1, auch NF- κ B aktiviert wird [Kempf *et al.*, 2005a].

Neben der Entzündung- und Immunreaktion reguliert NF- κ B auch das Überleben von Zellen. NF- κ B aktiviert hierbei diverse antiapoptotische Proteine (TRAF-1, TRAF-2, cIAP-1, cIAP-2) und scheint so entscheidend an antiapoptotischen Prozessen beteiligt zu sein. So wurde festgestellt, dass die NF- κ B-Aktivierung durch TNF zu einer reduzierten, die Inhibition der NF- κ B-Translokation aber zu einer erhöhten Apoptoserate führte [Wang *et al.*, 1996]. Gerade für Prozesse innerhalb der Onkogenese (z.B. B-Zell-Neoplasien) scheint NF- κ B eine

wichtige Rolle zu spielen, wobei die Aktivierung von NF- κ B durch Onkogene, Tumorzellen nicht nur vor Apoptose schützt, sondern auch indirekt über Einfluss auf Zellproliferation, -differenzierung und Angiogenese das weitere Tumorwachstum und die Metastasierung stimuliert werden [Li *et al.*, 1999; Baldwin, 2001].

4.2.2 Apoptoseinhibition in verschiedenen Zelllinien durch *B. henselae*

Bei einer *B. henselae*-Infektion kann eine Apoptoseinhibition durch Einfluss des Bakteriums sowohl auf frühe als auch auf späte Prozesse u.a. in Endothelzellen oder Monozyten beobachtet werden. Dies erfolgt entweder durch eine Störung der Caspasenaktivität oder indem die DNA-Fragmentierung gehemmt wird [Kirby und Nekorchuk, 2002; Kempf *et al.*, 2005b]. Neben NF- κ B trägt aber auch die VEGF-Sekretion der infizierten Zellen zur Erhöhung der Viabilität bei. So werden unter VEGF-Stimulation beispielsweise antiapoptotische Gene wie A1, Bcl-2, Survivin und XIAP exprimiert. Wie Abb. 22 zeigt, erfolgt die Apoptoseinhibition durch VEGF über den PI3-Kin/AKT-*pathway* und durch Inhibition der Caspasen [Tran *et al.*, 1999; Ferrara, 2001]. Somit ist es durchaus möglich, dass VEGF bei einer *B. henselae*-Infektion selbst einen „antiapoptotischen Präfaktor“ darstellen könnte [Kirby und Nekorchuk, 2002].

Die Proteine Survivin und XIAP zählen zur Familie *inhibitor of apoptosis* (IAP). Sie können die Apoptose u.a. durch Inaktivierung der Caspasen 3 und 9 hemmen, wobei ihre Transkription durch NF- κ B erfolgt [Stehlik *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 1997]. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass *B. henselae* in Mono Mac 6-Zellen ebenfalls Mitglieder der IAPs induziert, nämlich cIAP-1 und -2 [Kempf *et al.* 2005b]. Von diesen ist bekannt, dass sie durch Bindung und Hemmung der Caspasen 3 und 9 Apoptose inhibieren [Wahl *et al.*, 2003].

Im Rahmen der *B. henselae*-Infektion wurde auch eine Bcl-2-Induktion beschrieben. McCord *et al.* (2006) untersuchten hier die IL-8-abhängige Expression von Bcl-2 in HUVEC. Bisher ist jedoch nicht geklärt, ob Bcl-2 direkt durch VEGF, durch das NF- κ B-regulierte IL-8 oder durch andere Mechanismen bei der Infektion induziert wird. Es ist zu erwähnen, dass die Behandlung von HDMEC mit IL-8 im Gegensatz zu VEGF zu keiner gesteigerten Expression von Bcl-2 bzw. der davon abhängigen Apoptoseinhibition führte [Nör *et al.*, 1999].

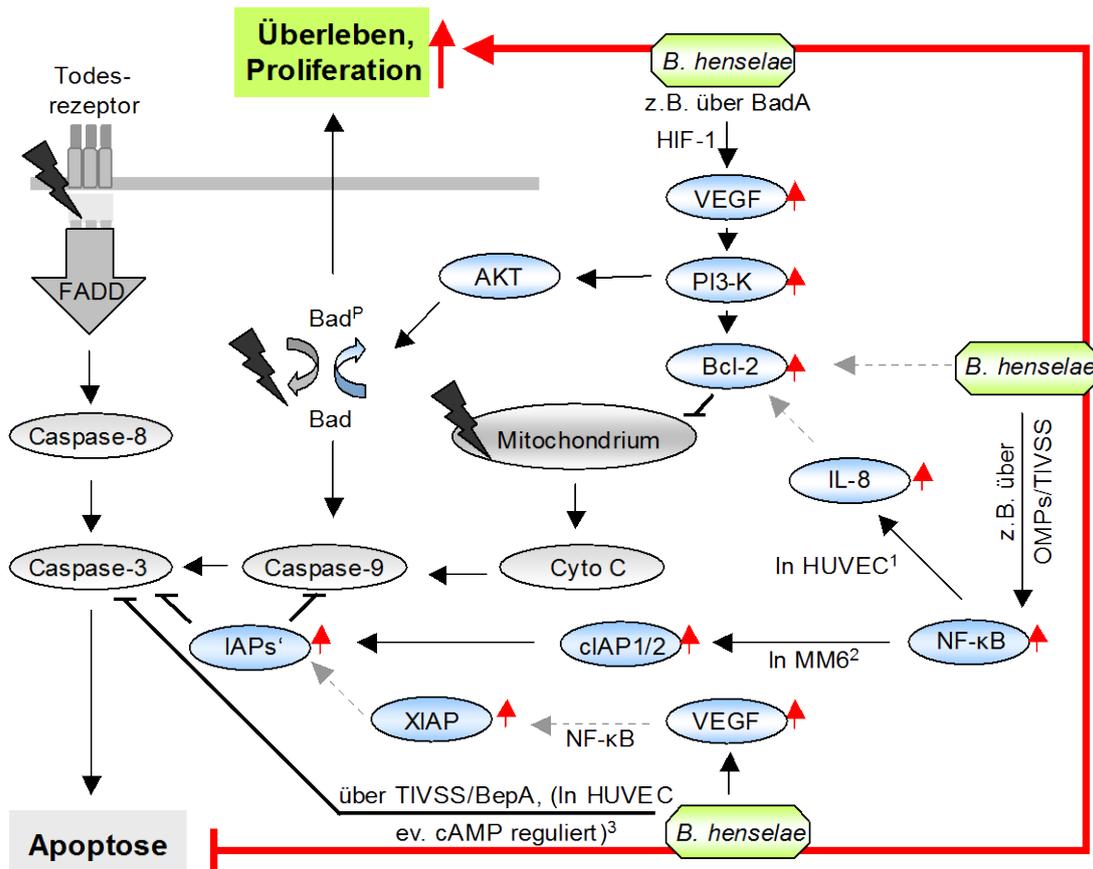


Abb.22: Mögliche Strategien von *B. henselae*, um Apoptose in Zielzellen zu inhibieren und sein Überleben in Wirtszellen zu sichern. *B. henselae* induziert VEGF, das Apoptose über den PI3/Akt-Pathway inhibiert. Bei Behandlung von *B. henselae*-infizierten MM6-Zellen mit einem VEGF-Antikörper wird die PDTC-induzierte Apoptose immer noch inhibiert. Daher scheint VEGF allein in MM6-Zellen nicht für die Apoptoseinhibition ursächlich zu sein.

¹*B. henselae*-infizierte HUVEC exprimieren IL-8-abhängig Bcl-2, was durch Hemmung der Cytochrom C-Freilassung Apoptose inhibieren kann. In HDMEC erfolgt die Bcl-2 Induktion aber über VEGF, was andeutet, dass diverse Zelltypen verschieden auf solche Signale reagieren.

²In mit *B. henselae*-infizierten MM6-Zellen kommt es zur Induktion von cIAP1 und cIAP2. VEGF induziert zudem XIAP. IAP's inhibieren durch Inaktivierung von Schlüsselcaspasen Apoptose.

³Neben BadA und den OMPs spielt auch das TIVSS, nicht nur wegen der NF-κB-Aktivierung, eine Rolle bei der Apoptoseinhibition. Ein durch dieses TIVSS transportiertes Protein (BepA), entfaltet in HUVEC durch Senkung der Caspasenaktivität eine antiapoptotische Wirkung. So ist *B. henselae* vermutlich fähig je nach Zielzelle unterschiedliche bzw. synergistische Wege einzuleiten, um die Apoptose gezielt zu inhibieren. Nach: Daten der Arbeitsgruppe; Nör *et al.*, 1999; Tran *et al.*, 1999; Ferrara 2004; Schairer, 2004; McCord *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2006.

Es wurde gezeigt, dass *B. henselae* in Monozyten die PDTC-induzierte und in Epithelzellen die Staurosporin-induzierte Apoptose inhibieren. PDTC interagiert mit Sauerstoffmetaboliten und inhibiert NF-κB, was in der Induktion der Caspase 3 und damit der Caspasenkaskade resultiert. Außerdem wird Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt. Beides führt letztlich zur Apoptose [Della Ragione *et al.*, 2000; Wahl *et al.*, 2001]. Staurosporin induziert Apoptose

ebenfalls über die mitochondriale Caspasenaktivierung [Bertrand *et al.*, 1994]. Im Vergleich zu PDTC-behandelten Mono Mac 6-Zellen war die Viabilität der *B. henselae*-infizierten Zellen signifikant erhöht, wobei *B. henselae*-infizierte Zellen eine geringere DNA-Fragmentierung aufwiesen als nicht-infizierte und als PDTC-behandelte Zellen (Abb. 18a/b). Außerdem regt *B. henselae* auch mit PDTC-behandelte Mono Mac 6-Zellen zu einer vermehrten VEGF-Sekretion an (Abb. 19). Ähnlich äußerte sich dies bei der Infektion mit HeLa 229-Zellen. Der Viabilitätsverlust durch die Staurosporin induzierte Apoptose konnte durch *B. henselae* nahezu vollständig unterdrückt werden. Hier ähnelte die Viabilitätsrate der Staurosporin-behandelten und *B. henselae*-infizierten HeLa 229-Zellen derer der mit hitzegetöteten *B. henselae*-behandelten Zellen (Abb. 20).

Auch von *E. coli* K1 ist bekannt, dass sie in Makrophagen überleben und infizierte Zellen vor einer Staurosporin-induzierten Apoptose bewahren können, wobei der antiapoptotische Effekt hier durch das *outer membrane protein A* ausgelöst wird [Sukumaran *et al.*, 2004]. Auch *B. henselae* verfügt über OMPs, die die Adhärenz an die Zelle erhöhen und zur Aktivierung des antiapoptotischen NF- κ Bs beitragen [Burgess und Anderson, 1998; Fuhrmann *et al.*, 2001]. Die NF- κ B-Aktivität wird zudem auch durch das TIVSS mitreguliert. Inzwischen konnte BepA, das durch das TIVSS in die Zelle transportiert wird, als antiapoptotisch wirkendes Protein identifiziert werden. An HUVEC wurde gezeigt, dass BepA zu einer Erhöhung des cAMP-Plasmaspiegels führt, was im Verlauf, u.a. durch Aktivierung der Proteinkinase A, zur Apoptoseinhibition führt [Schmid *et al.*, 2006]. Demnach scheint *B. henselae* über verschiedenste Möglichkeiten zu verfügen, um Apoptose in der Zielzelle zu inhibieren.

4.2.3 Die Bedeutung der Zelladhärenz von *B. henselae* als Wegbereiter antiapoptotischer Prozesse

Mit seinem TAA (*trimeric autotransporter adhesin*) BadA hemmt *B. henselae* nicht nur die Phagozytose durch J774A.1-Makrophagen, sondern vermittelt auch die für die Pathogenität wichtige Adhärenz an EZ. So weisen BadA⁻ *B. henselae* im Vergleich zum Wildtyp eine bis zu 90% geringere Adhäsion und Invasion auf [Dehio *et al.*, 1997; Kempf *et al.*, 2000; Riess *et al.*, 2004].

Darüber hinaus kommt es zu einer weniger stark ausgeprägten angiogenen Reaktion, wobei VEGF, HIF-1 α und auch andere angiogene Faktoren vermindert exprimiert werden [Kempf *et al.*, 2001a]. Entsprechend wurde gezeigt, dass es bei Infektion von HeLa 229- und HUVE-Zellen mit BadA⁻ *B. henselae* zu einer schwächeren Induktion von VEGF und IL-8 auf mRNA-Ebene kommt (Abb. 7,8).

Allerdings konnte noch nicht geklärt werden, ob ausschließlich BadA für die HIF-1-Aktivierung und die anschließende VEGF-Induktion ursächlich ist. So könnte es als Wegbereiter, mittels Sicherstellung von Adhärenz und Invasion anderen Pathogenitätsfaktoren, wie z.B. dem TIVSS von *B. henselae*, die Grundlage für ihr Wirken liefert. Für diese Annahme würde auch die vermehrte IL-8-Induktion sprechen, wenn man in Betracht zieht, dass dieses hierbei durch NF- κ B induziert wird, das vermutlich wiederum über das TIVSS aktiviert wird.

4.3 Vergleichende Betrachtungen gramnegativer intrazellulärer Bakterien - *B. henselae* ein Bakterium mit besonderen Fähigkeiten

Da zwischen erhöhter Viabilitätsrate in *B. henselae*-infizierten Zellen und der Inhibition der Apoptose Zusammenhänge beobachtet werden können, wurden Viabilitätsexperimente mit diversen Vergleichsbakterien durchgeführt. Hierfür kamen neben *B. henselae* auch *Y. enterocolitica* pYV⁺ und pYV⁻, *E. coli* HB 101 und HB 101 inv⁺, *L. pneumophila* und *L. monocytogenes* zum Einsatz.

Y. enterocolitica sind gramnegative Bakterien, die zu gastrointestinalen Erkrankungen führen können. Ein wichtiger Virulenzfaktor von *Y. enterocolitica* ist das Virulenzplasmid (pYV), das diverse Effektorproteine - *Yersinia outer proteins* (Yop) - und das TIISS kodiert. Mittels dem TIISS kann das Bakterium Yops in die Zelle schleusen, die dann die Zytotoxizität in Epithelzellen und die NF- κ B-Aktivität inhibieren können. Darüber hinaus kann dabei durch Inhibition weiterer Zytokine z.B. in Makrophagen auch Apoptose induziert werden [Rosqvist und Wolf-Watz, 1986]. Die Yops führen u.a. zu einer Störung des Aktingerüsts, wodurch die Aufnahme von *Yersinia* in die Wirtszelle vermindert werden könnte. Entsprechend zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass das Bakterium überwiegend extrazellulär zu finden ist [Ruckdeschel *et al.*,

1998; Erfurth *et al.*, 2004]. Einer Variante, der dieses Virulenzplasmid fehlt, ist im Gegensatz zum Wildtyp *Y. enterocolitica* pYV⁺ dazu fähig, IL-8 zu induzieren, was daran liegen könnte, dass pYV normalerweise die Immunantwort der Wirtszelle unterdrückt [Schulte *et al.*, 1996; Grassl *et al.*, 2003].

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass nach 48h die Viabilität der mit *Y. enterocolitica* (pYV⁺, pYV⁻) infizierten Zellen deutlich unterhalb der Viabilität der Negativkontrolle lag. Dies ist auf die Zytotoxizität der Bakterien zurückzuführen, wobei aber auch eine mögliche Induktion der Apoptose ursächlich sein könnte. Diesbezüglich wurde jedoch bereits gezeigt, dass pYV⁻ im Gegensatz zu viablen pYV⁺ Yersinien keine Apoptose in murinen dendritischen Zellen auslösen [Erfurth *et al.*, 2004]. Allerdings wiesen andere Arbeitsgruppen nach, dass *Y. enterocolitica* (pYV⁺, pYV⁻) zwar zu zytotoxischen Veränderungen (Ablösung von der Matrix, Abrundung der Zellen und NF-κB-Hemmung) führen, jedoch die Mehrheit der Zellen nicht apoptotisch reagiert und keine deutliche Viabilitätsminderung vorlag. Hierbei ist aber anzumerken, dass der Verlauf der Infektion nur über maximal 20 Stunden untersucht wurde [Ruckdeschel *et al.*, 1998]. Es konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass die Mehrzahl der HeLa 229-Zellen nach Infektion mit *Y. enterocolitica* bei kürzerer Infektionsdauer (12 und 24 h) im Zellrasen noch viabel erschienen. Der Zellrasen der infizierten Zellen wies nach Anfärbung aber auch schon erste Veränderungen auf. Darüber hinaus wurde im Vergleich zur Negativkontrolle im MTS-Assay bereits nach 12 h eine Viabilitätsminderung gemessen (Abb. 14).

Es ist also möglich, dass die Zytotoxizität der Yersinien erst später im Verlauf der Infektion zum Tragen kommt und zu frühen Infektionszeitpunkten noch keine starken mikroskopischen Veränderungen nachweisbar sind. Dies würde auch das Bild der zusätzlich mit Gentamicin behandelten Zellen erklären. Nur bei Zugabe von Gentamicin 1 h nach der Infektion konnten sich die Zellen teilweise erholen, wobei die Viabilität von mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ infizierten Zellen nahezu derer der Negativkontrolle glich (Abb. 15,16). Im Gegensatz zu viablen scheinen hitzegetötete Yersinien keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen zu haben, die sich wie die Viabilität der Negativkontrolle verhielt. Dies könnte u.a. dafür sprechen, dass die Faktoren zur Zytotoxizität hitzelabil sind.

E. coli können u.a. zu Durchfall-, Harnwegserkrankungen, Meningitis und sogar zur Sepsis führen. Die gramnegativen Bakterien verfügen über diverse Virulenzfaktoren, wie u.a. Endo- bzw. Enterotoxine und Adhäsine (P-Fimbrium). So sind UPEC z.B. fähig die NF- κ B-Aktivierung und die I κ B-Degradierung von Wirtszellen zu inhibieren, was zu einer erhöhten Apoptoserate dieser Zellen führte. Allerdings wiesen uropathogene, Pili⁺-*E. coli* eine niedrigere Apoptoserate auf, als Pili⁻-*E. coli*. Es zeigte sich, dass Pili⁺-Stämme nicht nur NF- κ B, sondern auch die MAP-Kinase Übermittlung inhibieren [Klumpp *et al.*, 2001].

In den Viabilitätstests wurde nachgewiesen, dass die Viabilität der mit *E. coli* infizierten Zellen mit der Infektionsdauer deutlich abfällt. Dieses Resultat korreliert mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [Abul-Milh *et al.*, 2001]. Es ist bekannt, dass *E. coli* inv⁺ die Induktion von IL-8, TNF- α , IL-1 α , β , MCP-1 sowie GM-CSF auslösen und damit eine proinflammatorische Wirtszellantwort stimulieren kann [Schulte *et al.*, 1998; Kampik *et al.*, 2000]. In Bezug auf eine mögliche VEGF-Induktion konnte aber gezeigt werden, dass beide Stämme keine signifikante VEGF-Induktion auslösen.

L. pneumophila führen in erster Linie zu Erkrankungen des Respirationstraktes. Das Bakterium verfügt über verschiedene Virulenzfaktoren, wie u.a. LPS, Flagellen und ein *heatshock protein* [Yoshizawa *et al.*, 2005].

L. pneumophila induziert mittels einem TIVSS Apoptose in Makrophagen und Monozyten. Aber das TIVSS scheint dem Bakterium auch das intrazelluläre Überleben in Vakuolen zu sichern [Neumeister *et al.*, 2002; Zink *et al.*, 2002]. Es wird vermutet, dass so der Abbau der bakterienenthaltenden Phagosome limitiert und die bakterizide Wirkung von Makrophagen reduziert wird, was dem Bakterium die intrazelluläre Replikation erleichtern könnte. Bei anhaltender Infektion wirkt *L. pneumophila* aber zytotoxisch und es kommt zur Zellnekrose. Dann könnte das *pore-forming-toxin* von *L. pneumophila* die Freilassung der Bakterien initiieren und anschließend weitere Zellen befallen werden. Da weder hitzegetötete noch der Überstand von mit *L. pneumophila* infizierten Zellen Apoptose induzieren, scheinen aktive Mechanismen für die Apoptose ursächlich zu sein [Gao und Abu-Kwaik, 1999; Walz *et al.*, 2000; Neumeister *et al.*, 2002].

Hier wurde gezeigt, dass *L. pneumophila* in HeLa 229-Zellen zu keiner VEGF-Induktion auf Proteinebene führen und die Zellviabilität nach Infektion stark abfällt. Allerdings ist anzumerken, dass nach Abtöten der Bakterien mit Gentamicin die Viabilitätsrate auf das Niveau der Negativkontrolle anstieg. Dieser Effekt könnte z.B. auf eine vermehrte Proliferationsrate der verbliebenen Zellen entstanden sein. So wurde gezeigt, dass HUVEC in Kulturen unter Standardbedingungen zu einem gewissen Grad apoptotisch werden und der Freiraum zwischen den Zellen dann wieder zur neuen Proliferation der Zellen führt [Kaiser *et al.*, 1997].

L. monocytogenes ist ein grampositives Stäbchenbakterium. Die Infektion von hämatogenen *L. monocytogenes* kann bei der Infektion der Leber zur Ausbildung von Mikroabszessen und zu einer erhöhten Apoptoserate von Hepatozyten führen. Die Hepatozyten produzieren Chemokine, wodurch Neutrophile angezogen und gebunden werden, die nun versuchen die apoptotischen Hepatozyten zu entfernen und die freigesetzten Listerien abzutöten. Hierbei wäre der programmierte Zelltod von Hepatozyten ein wichtiger Schritt in der Abwehr von intrazellulären Pathogenen, noch bevor die Ig-spezifische Immunantwort erfolgen kann [Rogers *et al.*, 1996]. Mittels eines Hämolytins, dem Lysteriolysin, können *L. monocytogenes* in Makrophagen und Leukozyten die Zellyse induzieren und sich so nach der intrazellulären Replikation auf andere Zellen ausbreiten. Man weiß, dass sie in dendritischen Zellen Apoptose induzieren, in Makrophagen jedoch Nekrose verursachen. Makrophagen stellen jedoch eines der wichtigsten Habitate von Listerien dar. So wird vermutet, dass die Induktion der Nekrose für das Bakterium derart von Nutzen ist, dass es nicht durch die sofortige Reaktion von Phagozyten erkannt und eliminiert wird, wie es bei der Apoptose der Fall wäre [Barsig und Kaufmann, 1997].

Die Infektion von HeLa 229-Zellen mit Listerien führte zum Untergang der Zellen. Nach Gentamicinzugabe glich die Zellviabilität derjenigen der Negativkontrolle. Außerdem konnte keine VEGF-Sekretion nachgewiesen werden. Dies stimmt mit Daten überein, wo gezeigt wurde, dass *L. monocytogenes* auch in EA.hy 926-Zellen keine VEGF-Induktion auslösen [Kempf *et al.*, 2001a].

B. henselae inhibiert Apoptose und erhöht die Viabilität von Wirtszellen. Selbst abgetötete *B. henselae* können noch zu einer gesteigerten Zellviabilität führen. Daher sollte die Viabilität und die VEGF-Sekretion von HeLa 229-Zellen nach *B. henselae*-Infektion mit der von anderen Bakterien verglichen werden.

Es wurde bereits erörtert, dass die *B. henselae*-Infektion in der Wirtszelle zu einer Induktion von VEGF, der ein *survival factor* für EZ darstellt, führt. Sowohl hitzegetötete als auch durch Gentamicin abgetötete *B. henselae* konnten die Viabilität von HeLa 229-Zellen ähnlich steigern, wie viable *B. henselae*. Allerdings konnten hitzegetötete *B. henselae* die VEGF-Sekretion nicht induzieren (Abb. 13, 14a/b, 15c, 16, 17). Somit scheint VEGF nicht allein für die Zellviabilität ursächlich zu sein, wobei seine Induktion sicherlich Synergieeffekte entfaltet. Interessant war, dass nach einer späteren Zugabe von Gentamicin eine erhöhte VEGF-Sekretion gemessen wurde. Dies könnte dafür sprechen, dass viable Bakterien zunächst die VEGF-Induktion auf mRNA-Ebene initiieren und später dann auch dessen Translation eingeleitet wird.

Die Array-Experimente zeigten, dass HIF-1 bei einer *B. henselae*-Infektion eine Schlüsselrolle zukommt. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte entsprechend auch nach 3 bis 6 h die höchste Aktivierung von HIF-1-mRNA und nach 6 h das HIF-1-Protein nachgewiesen werden [Kempf *et al.*, 2005a]. Dies deckt sich mit den Daten für die Induktion der HIF-1-regulierten Zytokine, wobei bis zur Translation 24 h und 72 h benötigt wurden. Auch von anderen Bakterien, wie z.B. Chlamydien, ist bekannt, dass es bei der Infektion zu einer Aktivierung von HIF-1-regulierten Genen oder HIF-1 kommt [Xia *et al.*, 2003]. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass bei Infektion von HeLa 229-Zellen mit *E. coli* und *Y. enterocolitica* eine Aktivierung von HIF-1-mRNA erfolgt, allerdings keine VEGF-Induktion ausgelöst wird, was eventuell auf die erhöhte Zytotoxizität dieser Bakterien zurückzuführen ist [Eehalt, 2004]. Eventuell ist bei einer *B. henselae*-Infektion aber eine stärkere und länger anhaltende Induktion von HIF-1 in der Zielzelle ausschlaggebend für die Translation und die anschließende Signalkaskade sowie Zytokinaktivierung. Nicht zuletzt scheint bei *B. henselae* ein komplexes, aufeinander abgestimmtes und zielgerichtetes pro-angiogenetisches und antiapoptotisches Pathogenitätsprogramm vorzuliegen.

Zudem führt auch die Behandlung mit Gentamicin-behandelten und hitzegetöteten *B. henselae* zu einer Steigerung der Viabilität von HeLa 229-Zellen (Abb. 14a/b,15a/b,21). Gentamicin hemmt die Proteinbiosynthese. Dies zeigt, dass die Viabilitätssteigerung, im Gegensatz zur VEGF- und IL-8-Induktion, nicht vom viablen Bakterium, sondern z.B. von hitzestabilen Proteinen oder anderen präformierten Faktoren abhängig ist (Abb. 13). Entsprechend scheint die VEGF- und IL-8-Induktion in der Wirtszelle aktiv durch das Bakterium, z.B. durch das TIVSSs, eingeleitet und reguliert zu werden. Allerdings konnte auch bei Einsatz von hitzegetöteten Referenzbakterien eine Viabilitätserhöhung der Zellen beobachtet werden (Abb. 17). Dies deutet an, dass die Viabilitätserhöhung durch hitzegetötete *B. henselae* nicht spezifisch sein muss und dieser Effekt eventuell aufgrund des erhöhten Nährstoffangebots entstanden sein könnte. Jedoch wurde weiterhin gezeigt, dass bei Abtötung der Bakterien mit Gentamicin - im Gegensatz zu *B. henselae* - keine erhöhte Zellviabilität vorlag.

Zusammenfassend können sowohl viable *B. henselae* als auch mit Gentamicin abgetötete *B. henselae* im Vergleich zu anderen Bakterien die Zellviabilität erhöhen, wobei zu überprüfen wäre, ob dies ein Resultat von sehr frühen Einflüssen des Bakteriums auf die Zellen ist. So wäre es denkbar, dass bereits während der Adhäsion oder der beginnenden Invasion die infizierte Zelle vom Bakterium tiefgreifend moduliert wird. Zudem könnte *B. henselae* eventuell bisher noch unbekannte Proteine aktiv bereits schon früh ins Medium sezernieren, welche im Verlauf der Infektion unabhängig von einer weiteren direkten Stimulation durch *B. henselae* die bekannten Effekte auslösen. Schließlich wäre aber noch zu untersuchen, ob der viabilitätssteigernde Effekt auch durch spezifische präformierte Faktoren von *B. henselae* verursacht werden kann.

4.4 Modulationsdynamik von Angiogenese und Apoptose im Rahmen einer *B. henselae*-Infektion

Gerade das Ausmaß der Gefäßproliferationen ist kennzeichnend für das angiogenetische Potential, das *B. henselae* bei der Infektion von EZ entfaltet. Allerdings sind auch entzündliche Infiltrate mit Neutrophilen, Makrophagen und Monozyten histologisch sichtbar, was auf inflammatorische Prozesse hinweist

[Adal *et al.*, 1994; Monteil *et al.*, 1994]. Im Vergleich zur Angiogenese scheint die Entzündung aber nur gering ausgeprägt zu sein. Dies könnte daran liegen, dass *B. henselae* diese direkt umgeht oder aber auch weil das eigentliche Habitat des Bakteriums eher immunkompromittierte Patienten darstellen. Abgesehen davon können HIF-1 und NF- κ B die Sekretion der angiogenetisch und antiapoptotisch wirkenden Zytokine schnell und stark erhöhen. Es bleibt unklar, ob die mitogene Aktivität oder die Stressantwort die Sekretion der vaskuloproliferativen Zytokine in Gang setzt. So aktiviert *B. henselae* mittels TIVSS schon früh NF- κ B, das die Stressantwort reguliert. Dadurch stellt sich die Frage, welchen Weg (HIF-1/Angiogenese oder NF- κ B/Stressantwort) *B. henselae* zuerst induziert und ob der nachfolgende Weg damit aktiv durch das Bakterium gesteuert wird oder nur reaktiv durch die anschließende Signalkaskade erfolgt.

B. henselae induziert in verschiedenen Zellen eine VEGF-Sekretion, welche jedoch die erhöhte Zellviabilität nicht allein erklären kann. Entsprechend wurden in den Genarray-Experimenten noch weitere angiogen wirksame Zytokine entdeckt, deren Einfluss auf die Zellviabilität noch zu untersuchen bleibt. Somit kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die vermehrte Sekretion von anderen angiogenen Zytokinen für die erhöhte Viabilität ursächlich ist. Ein anderer Anhaltspunkt liefert aber die Fähigkeit von *B. henselae*, die Apoptose in der Wirtszelle zu inhibieren. Es konnte gezeigt werden, dass bei Inhibition der durch PDTC und Staurosporin induzierten Apoptose durch *B. henselae* nicht nur die Viabilität der Zellen erhöht war, sondern auch eine geringere DNA-Fragmentierung vorlag (Abb. 18a/b,20). Dies legt den Verdacht nahe, dass die Inhibition der Apoptose für die erhöhte Viabilität mit ursächlich ist. Unklar bleibt, ob dies ein wesentlicher Mechanismus von *B. henselae* darstellt oder ob er einfach dazu dient, eine unspezifische Wirtzellreaktion auszulösen und den damit resultierenden, von der Wirtszelle bei einer Infektion eingeleiteten, programmierten Zelltod zu umgehen.

Insgesamt bietet die erhöhte Wirtszellviabilität einen strategischen Vorteil, da sich das intrazelluläre *B. henselae* durch Induktion der Angiogenese, „Immunevasion“ und damit geringer Entzündung optimale Lebensgrundlagen schafft und zudem seinen Lebensraum vergrößern und absichern kann.

4.5 Ausblick

Die Induktion der Angiogenese und die Inhibition der Apoptose stellen wichtige Pathomechanismen für *B. henselae* dar. Vergleichende Versuche mit anderen Bakterien ergaben, dass die Viabilitätssteigerung und die VEGF-Induktion vermutlich sogar spezifisch für *B. henselae* sind. Die Daten aus den Genarray-Experimenten deuten zudem an, dass *B. henselae* Zellen auf verschiedene Arten stimuliert. So werden vermutlich Zellen, die nicht direkt die Zielzellen von *B. henselae* darstellen, durch das Bakterium eher dazu angeregt, vermehrt stimulierende Zytokine zu sezernieren. Andererseits jedoch macht *B. henselae* EZ gerade für diese Zytokine empfänglicher (z.B. durch vermehrte Expression von bestimmten Rezeptoren). Aus diesem Grund ermöglicht eine *B. henselae*-Infektion auch grundlegende Einblicke in die Interaktionsformen von Zellen, was durch die - auch im Genarray nachgewiesene - Nähe zu tumorösen und angiogenen Prozessen von großem Interesse ist.

Bei der *B. henselae*-Infektion stellen HIF-1 und NF- κ B wichtige Transkriptionsfaktoren dar. Aber auch andere Transkriptionsfaktoren (z.B. JunB) könnten die beobachteten Effekte induzieren. Abb. 21 und 22 zeigen verschiedene nachgewiesene und mögliche Signalkaskaden, die von Bedeutung sein könnten. Hier wäre es interessant zu wissen, wie die Signalkaskaden auf molekularbiologischer Ebene zeitlich ablaufen bzw. zusammenhängen. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob die Prozesse der Angiogenese und der Apoptose tatsächlich unabhängig voneinander erfolgen oder sich gegenseitig bedingen. Damit könnte aber auch herausgearbeitet werden, inwiefern die einzelnen Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums (BadA, OMPs, TIVSS, Beps, etc.) separat oder aufeinander abgestimmt auf die infizierte Zellart einwirken. Das Verständnis über die Interaktion einzelner Zellen und deren Zytokine könnte in der Zukunft z.B. dazu beitragen, Prozesse der Tumorentstehung, des Wachstum und der Metastasierung besser zu verstehen. Das Wissen, welches sich aus der Aufklärung der Angiogenese und der Apoptose anhand des Modells der *B. henselae*-Infektion ergibt, könnte dann sogar therapeutisch, z.B. bei der Behandlung von Tumoren oder Gefäßerkrankungen, genutzt werden.

5. Zusammenfassung

Eine Infektion mit *B. henselae* löst in Endothelzellen ein angiogenes Programm aus und führt zudem zur Inhibition der Apoptose. Beides resultiert letztendlich in einer deutlich gesteigerten Aktivität und Viabilität der infizierten Zellen. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Durchführung von Genarray-Experimenten von infizierten HeLa 229- und HUVE-Zellen gezeigt werden, dass neben VEGF (VEGF-A) auch eine Vielzahl weiterer angiogener und antiapoptotischer Gene eine wichtige Rolle spielen.

Im Einzelnen brachte die vorliegende Arbeit folgende Ergebnisse hervor:

1. *B. henselae* führte zur Induktion der VEGF-mRNA und des VEGF-Proteins in HeLa 229-, HUVE-, EA.hy 926- und Mono Mac 6-Zellen, wobei insbesondere die kurzen löslichen VEGF-Isoformen induziert wurden.
2. *B. henselae* führte zudem zu einer Induktion von IL-8 auf mRNA- und Proteinebene in HeLa 229- und HUVE-Zellen.
3. *B. henselae* induziert in HeLa 229-Zellen ein angiogenes Programm, wobei viele der induzierten Gene direkt oder indirekt durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert werden.
4. In infizierten HUVE-Zellen wurde ebenfalls ein angiogenes Genmuster durch *B. henselae* induziert, wobei zusätzlich auch Gene reguliert wurden, die im Rahmen von Inflammation, Apoptose, Zellmetabolismus, Signaltransduktion und der Karzinogenese von Bedeutung sind. Bei der Infektion von Endothelzellen mit *B. henselae* scheint neben HIF-1 auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine wichtige Rolle zu spielen.
5. *B. henselae* führte in infizierten HeLa 229-Zellen - im Gegensatz zu anderen Bakterien - zu einer signifikanten Viabilitätssteigerung.
6. Auch hitzegetötete und Gentamicin-behandelte *B. henselae* führte zu einer Viabilitätssteigerung von HeLa 229-Zellen.
7. Hitzegetötete *B. henselae* und eine Behandlung mit Gentamicin zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion führen in HeLa 229-Zellen zu keiner vermehrten VEGF-Sekretion.

8. Im Vergleich zu anderen fakultativ intrazellulären Bakterien ist die VEGF-Induktion und die Viabilitätssteigerung ein spezifischer Prozess von *B. henselae*.
9. Viable *Y. enterocolitica* (pYV⁺, pYV⁻), *E. coli* (HB 101, HB 101 inv⁺), *L. pneumophila* und *L. monocytogenes* führen bei einer Infektion zu keiner wesentlichen VEGF-Sekretion oder Viabilitätsbesserung von HeLa 229-Zellen.
10. *B. henselae* inhibiert die durch PDTC ausgelöste Apoptose in Mono Mac 6-Zellen, was sich in einer verringerten DNA-Fragmentierung und gesteigerter Viabilität äußert.
11. *B. henselae* und hitzegetötete *B. henselae* inhibieren die durch Staurosporin induzierte Apoptose in HeLa 229-Zellen.

Diese Arbeit erhöht das Verständnis über den Ablauf der Infektion mit *B. henselae*, wobei die VEGF-Sekretion und die Apoptoseinhibition wesentliche Pathogenitätsmechanismen des Bakteriums darstellen. Übergeordnet führt diese Arbeit somit auch zu einem breiteren Verständnis über Angiogenese und Apoptose insbesondere im Rahmen einer *B. henselae*-Infektion. Zusätzlich konnten Parallelitäten zur Tumorangiogenese aufgedeckt werden, die nach besserem Verständnis in Zukunft dazu beitragen könnten, neue Perspektiven und Grundlagen der Tumorforschung zu liefern.

6. Literaturverzeichnis

1. Abul-Milh,M., Wu,Y., Lau,B., Lingwood,C.A. & Foster,D.B. (2001). Induction of epithelial cell death including apoptosis by enteropathogenic *Escherichia coli* expressing bundle-forming pili. *Infect Immun* 69:7356-7364.
2. Adal,K.A., Cockerell,C.J. & Petri-WA,J. (1994). Cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and other infections due to *Rochalimaea*. *N Engl J Med* 330:1509-1515.
3. Airene,S., Surcel,H.M., Tuukkanen,J., Leinonen,M. & Saikku,P. (2002). *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scand J Immunol* 55:390-398.
4. Anderson,B., Jones,D. & Burgess,A. (1996). Cloning, expression and sequence analysis of the *Bartonella henselae* gene encoding the HtrA stress-response protein. *Gene* 178(1-2):35-8.
5. Anderson,B.E. & Neuman,M.A. (1997). *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* 10:203-219.
6. Aplin,A., Gelati,M., Fogel,E., Carnevale,E. & Nicosia,R.F. (2006). Angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor induce expression of inflammatory cytokines before angiogenesis. *Physiol Genomics* 27:20-28.
7. Arends,M.J. & Wyllie,A.H. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32:223-54.
8. Arora,K.K., Fanciulli,M. & Pedersen,P.L. (1990). Glucose phosphorylation in tumor cells. Cloning, sequencing, and overexpression in active form of a full-length cDNA encoding a mitochondrial bindable form of hexokinase. *J Biol Chem* 265: 6481-6488.
9. Ausprunk,D.H. & Folkman,J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 14: 53-65.
10. Autenrieth,I.B., Tingle,A., Reske-Kunz,A. & Heesemann, J. (1992). T Lymphocytes Mediate Protection against *Yersinia enterocolitica* in Mice: Characterization of Murine T-Cell Clones Specific for *Y. enterocolitica*. *Infect Immun* 60:1140-1149.
11. Autenrieth,I.B. & Firsching,R. (1996). Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol* 44:285-294.

12. Autenrieth, I.B. & Haimerl, M. (1998). Human Diseases - Apart from Cat-Scratch Disease, Bacillary Angiomatosis, and Peliosis - and Carriership Related with *Bartonella* and *Afipia* Species. In: Schmidt A. (ed) (1998). *Bartonella* and *Afipia* Species Emphasizing *Bartonella henselae*. *Contrib Microbiol* Basel, Karger; vol 1; pp. 63-76.
13. Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250:91-104.
14. Baldwin, A.S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest* 107(3):241-246.
15. Baran, J., Weglarczyk, K., Mysiak, M., Guzik, K., Ernst, M., Flad, H. D. & Pryjma, J. (2001). Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 69:1287-1297.
16. Barleon, B., Sozzoni, S., Zhou, D., Weich, H.A., Mantovani, A. & Marme, D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336-3343.
17. Barsig, J. & Kaufmann, S.H.E. (1997). The Mechanism of Cell Death in *Listeria monocytogenes*-Infected Murine Macrophages Is Distinct from Apoptosis. *Infect Immun* 65(10):4075-4081.
18. Batterman, H.J., Peek, J.A., Loutit, J.S., Falkow, S. & Tompkins, L.S. (1995). *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun* 63:4553-4556.
19. Benjamin, L.E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D. & Keshet, E. (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103(2):159-65.
20. Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K.W., & Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res* 211:314-321.
21. Bibb, W.F., Arnow, P.M., Dellinger, D.L. & Perryman, S.R. (1983). Isolation and characterization of a seventh serogroup of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 17:346-348.
22. Birtles, R.J. & Raoult, D. (1998). The Genera *Afipia* and *Bartonella*. In: Schmidt A. (ed) (1998). *Bartonella* and *Afipia* Species Emphasizing *Bartonella henselae*. *Contrib Microbiol* Basel, Karger; vol 1; pp.1-31.

23. Blouin,C.C., Page,E.L., Soucy,G.M. and Richard,D.E. (2004). Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood* 103: 1124-1130.
24. Borgstrom,P., Bourdon,M.A., Hillan,K.J., Sriramarao,P. & Ferrara,N. (1998). Neutralizing antivascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate* 35:1-10.
25. Boyer,H.W. & Roulland-Dussoix,D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41:45-472.
26. Brat,D.J., Bellail,A.C. & Van Meir,E.G. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* 7(2):122-133.
27. Burgess,A.W. & Anderson,B.E. (1998). Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. *Microb Pathog* 25(3):157-164.
28. Caniza,M.A., Granger,D.L., Wilson,K.H., Washington,M.K., Kordick,D.L., Frush,D.P. & Blitchington,R.B. (1995). *Bartonella henselae*: etiology of pulmonary nodules in a patient with depressed cell-mediated immunity. *Clin Infect Dis* 20:1505-1511.
29. Carithers,H.A. (1985). Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1.200 patients. *Am J Dis Child* 139:1124-1133.
30. Carithers,H.A. & Margileth,A.M. (1991). Cat-scratch disease. Acute encephalopathy and other neurologic manifestations. *Am J Dis Child* 145:98-101.
31. Carmeliet,P., Dor,Y., Herbert,J.-M., Fukumura,D., Brusselmanns,K., Dewerchin,M., Neemani,M., Bono,F., Abramovitchi,R., Maxwell,P., Koch,C.J., Ratcliffe,P., Moons,L., Jain,R.K., Collen,D. & Keshert,E. (1998). Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature* 394:485-490.
32. Carmeliet,P. & Jain,R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nat Med* 9:653-660.
33. Cerimele,F., Brown,L.F., Bravo,F., Ihler,G.M., Kouadio,P. & Arbiser,J.L. (2003). Infectious Angiogenesis: *Bartonella bacilliformis* Infection Results in Endothelial Production of Angiopoietin-2 and Epidermal Production of Vascular Endothelial Growth Factor. *Am J Pathol* 163:1321-1327.

34. Chang,A.C., Jellinek,D.A. & Reddel,R.R. (2003). Mammalian stannio-calcins and cancer. *Endocr Relat Cancer* 10:359-373.
35. Chavakis,E. & Dimmeler,S. (2002). Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:887-893.
36. Clifton,D.R., Goss,R.A., Sahni,S.K., van Antwerp,D., Baggs,R.B., Marder,V.J., Silverman,D.J., & Sporn, L.A. (1998). NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cellsurvival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4646-4651.
37. Cohen,G.M., Sun,X.M., Fearnhead,H., MacFarlane,M., Brown,D.G., Snowden,R.T., & Dinsdale,D. (1994). Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunol* 153:507-516.
38. Cohen,T., Gitay-Goren,H., Sharon,R., Shibuya,M., Halaban,R., Levi,B. & Neufeld,G. (1995). VEGF121, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell surface heparan sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells. *J Biol Chem* 270:11322-11326
39. Cohen,T. , Nahari,D., Cerem,L.W., Neufeld,G. & Levi,B.Z. (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271(2):736-741.
40. Colotta,F., Re,F., Polentarutti,N., Sozzani,S. & Mantovani,A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80(8):2012-2020.
41. Conley,T., Slater,L. & Hamilton,K. (1994). *Rochalimaea* species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro. *J Lab Clin Med* 124:521-528.
42. Cummins,E.P. & Taylor,C.T. (2005). Hypoxia-responsive transcription factors. *Eur J Physiol* 450(6):363-371.
43. Dehio,C., Meyer,M., Berger,J., Schwarz,H. & Lanz,C. (1997). Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci* 110 (Pt 18):2141-2154.
44. Dehio,C. (2004). Molecular and cellular basis of *bartonella* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 58:365-90.

45. Dehio,M., Québatte,M., Foser,S. & Certa U. (2005). The transcriptional response of human endothelial cells to infection with *Bartonella henselae* is dominated by genes controlling innate immune responses, cell cycle, and vascular remodelling. *Thromb Haemost* 94:347-361.
46. Delidow,B., Lynch,J., Peluso,J., & White,B. (1993). PCR Protocols - Current Methods and Applications. In: Harwood,AJ. (ed.) (1996). Basic DNA and RNA Protocols. *Humana Press* pp.275-291.
47. Della Ragione,F., Cucciolla,V., Borriello,A., Della Pietra,V., Manna,C., Galletti,P. & Zappia,V. (2000). Pyrrolidine dithiocarbamate induces apoptosis by a cytochrome c-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 268:942-946.
48. De Vries,C., Escobedo,J.A., Ueno,H., Houck,K., Ferrara,N. & Williams,L.T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255:989-991.
49. Ding,Y.-B.,Chen,G.-Y., Xia,J.-G., Zang,X.-W., Yang,H.-Y. & Yang,L. (2003). Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 9(7):1409-1414.
50. Drancourt,M. & Raoult,D. (1993). Proposed tests for the routine identification of *Rochalimaea species*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12:710-713.
51. Drancourt, M., Mainardi,J.L., Brouqui,P., Vandenesch,F., Carta,A., Lehnert,F., Etienne,J., Goldstein,F., Acar,J. & Raoult,D. (1995). *Bartonella (Rochalimaea) quintana* endocarditis in three homeless men. *N Engl J Med* 332(7):419-23.
52. Drancourt,M., Birtles,R., Chaumentin,G., Vandenesch,F., Etienne,J. & Raoult,D. (1996). New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet* 347:441-443.
53. Durrbaum-Landmann,I., Gercken,J., Flad,H.D. & Ernst,M. (1996). Effect of in vitro infection of human monocytes with low numbers of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on monocyte apoptosis. *Infect Immun* 64:5384-5389.
54. Dvorak,H.F., Detmar,M., Claffey,K.P., Nagy,J.A., van de Water,L. & Senger,D.R. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 107(1-3):233-235.
55. Edgell,C.J., McDonald,C.C. & Graham,J.B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3734-3737.

56. Eehalt,U. (2004). Aktivierung des *Hypoxia-Inducible Factor-1* (HIF-1) und Induktion proangiogenetischer Zytokine nach Infektion mit *Bartonella henselae*. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Tübingen.
57. Erfurth,S.E., Gröbner,S., Kramer,U., Gunst,D.S.J., Soldanova,I., Schaller, M., Autenrieth,I.B.,1 & Borgmann,S. (2004). *Yersinia enterocolitica* Induces Apoptosis and Inhibits Surface Molecule Expression and Cytokine Production in Murine Dendritic. *Infect Immun* 72(12):7045-7054.
58. Faure,E., Thomas,L., Xu,H., Medvedev,A., Equils,O. & Arditi,M. (2001). Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol* 166:2018-2024.
59. Ferrara,N. & Henzel,W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:851-858.
60. Ferrara,N. (1996). Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 32(A):2413-2422.
61. Ferrara,N. & Davis-Smyth,T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18:24-25.
62. Ferrara,N. (1999). Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 237:1-30.
63. Ferrara,N. & Alitalo,K. (1999). Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature* 5(12):1359-1364.
64. Ferrara,N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:1358-1366.
65. Ferrara,N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25:581-611.
66. Ferrara,N., Hillan,K. J., Gerber,H. P. & Novotny,W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3:391-400.
67. Findlay,J.K. (1986). Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinol* 111:357-366.
68. Folkman,J. & Haudenschild,C. (1980a). Angiogenesis in vitro. *Nature* 288:551-556.
69. Folkman,J. & Haudenschild,C. (1980b). Angiogenesis by capillary endothelial cells in culture. *Trans Ophthalmol Soc U K*.100(3):346-53.

70. Folkman, J. (1984a). Angiogenesis. In: Jaffe, E.A. (ed). *Biology of endothelial cells*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, The Hague, Dordrecht. pp 412-428.
71. Folkman, J. (1984b). What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 51:601-604.
72. Folkman, J. & Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* 235:442-447.
73. Folkman, J. (1990). Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev* 9(3):171-174.
74. Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27-31.
75. Fournier, P.-E. and Raoult, D. (1998). Cat-Scratch Disease and an Overview of Other *Bartonella henselae*-Related Infections. In: Schmidt A. (ed) (1998). *Bartonella and Afipia Species Emphasizing Bartonella henselae*. *Contrib Microbiol* Basel, Karger; vol 1; pp.1-31.
76. Fournier, P.-E., Robson, J., Zeaiter, Z., McDougall, R., Byrne, S. & Raoult, D. (2002). Improved culture from lymph nodes of patients with cat scratch disease and genotypic characterization of *Bartonella henselae* isolates in Australia. *J Clin Microbiol* 40(10):3620-3624.
77. Fuhrmann, O., Arvand, M., Gohler, A., Schmid, M., Krull, M., Hippenstiel, S., Seybold, J., Dehio, C. & Suttrop, N. (2001). *Bartonella henselae* induces NF-kappaB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Infect Immun* 69:5088-5097.
78. Fumarola, D.S., Pece, S., Fumarola, R., Petruzzelli, R., Greco, B., Giuliani, G., Maffione, A.B. & Jirillo, E. (1994). Downregulation of human polymorphonuclear cell activities exerted by microorganisms belonging to the alpha-2 subgroup of Proteobacteria (*Afipia felis* and *Rohmaliaea henselae*). *Immunopharmacol Immunotoxicol* 16:449-461.
79. Galland, F., Karamysheva, A., Mattei, M.-G., Rosnet, O., Marchetto, S. & Birnbaum, D. (1992). Chromosomal localization of FLT4, a novel receptor-type tyrosine kinase gene. *Genomics* 13:475-478.
80. Gao, L.-Y. & Abu-Kwaik, Y. (1999). Activation of Caspase 3 during *Legionella pneumophila*-Induced Apoptosis. *Infect Immun* 67:4886-4894.

81. Gerber,H.P., Condorelli,F., Park,J. & Ferrara,N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 272(38):23659-23667.
82. Gerber,H.P., McMurtrey,A., Kowalski,J., Yan,M., Keyt,BA., Dixit,V. & Ferrara,N. (1998). VEGF regulates endothelial cell survival by the PI3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Bio Chem* 273:30336-30343.
83. Gimbrone,M.A. Jr., Cotran,R.S. & Folkman,J. (1974). Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 60(3):673-84.
84. Gitay-Goren,H., Soker,S., Vlodavsky,I. & Neufeld,G. (1992). The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J Biol Chem* 267(9):6093-6098.
85. Gitay-Goren,H., Halaban,R. & Neufeld,G. (1993). Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 190:702-709.
86. Gitay-Goren,H., Cohen,T., Tessler,S., Soker,S., Gengrinovitch,S., Rockwell,P., Klagsbrun,M., Levi,B.-Z. & Neufeld,G. (1996). Selective binding of VEGF₁₂₁ to one of the three Vascular Endothelial Growth Factor Receptors of vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271(10):5519-5523.
87. Golden,S.E. (1993). Hepatosplenic cat-scratch disease associated with elevated anti-*Rochalimaea* antibody titers. *Pediatr Infect Dis J* 12:868-871.
88. Gomez,J., Garcia-Domingo,D., Martinez-A.,C. & Rebollo,A. (1997). Role of NF-KappaB in the control of apoptotic and proliferative responses in IL-2-responsive-T cells. *Front Biosci* 15(2):d49-60.
89. Gottschalk,L.R., Giannola,D.M. & Emerson,S.G. (1993). Molecular regulation of the human IL-3 gene: inducible T cell-restricted expression requires intact AP-1 and Elf-1 nuclear protein binding sites. *J Exp Med* 178:1681-1692.
90. Grant,D.S. & Kleinman,H.K. (1997). Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS* 79:317-333.
91. Grassl,G.A., Kracht,M., Wiedemann,A., Hoffmann,E., Äpfelbacher,M., von Eichel-Streiber,C., Bohn,E. and Autenrieth,I.B. (2003). Activation of NF-kappaB and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. *Cell Microbiol* 5:957-971.

92. Grimshaw,M.J., Hagemann,T., Ayhan,A., Gillett,C.E., Binder,C. & Balkwill,F.R. (2004). A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. *Cancer Res* 64:2461-2468.
93. Gross,A., Terraza,A., Ouahrani-Bettache,S., Liautard,J.P. & Dornand,J. (2000). In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun* 68:342-351.
94. Grützkau,A., Hanski,C., Hahn,H. & Riecken,E.O. (1990). Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 31:1011-1015.
95. Grutzkau,A., Kruger-Krasagakes,S., Baumeister,H., Schwarz,C., Kogel,H., Welker,P., Lippert,U., Henz,B.M. & Moller,A. (1998). Synthesis, storage and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF₂₀₆. *Mol Biol Cell* 9:875-884.
96. Guo,D., Jia,Q., Song,H.Y., Warren,R.S. & Donner,D.B. (1995). Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 270(12):6729-33.
97. Harrison,T.G. & Doshi,N. (1999). Serological evidence of *Bartonella* spp. infection in the UK. *Epidemiol Infect* 123(2):233-40.
98. Haught,W.H., Steinbach,J., Zander,D.S. & Wingo,C.S. (1993). Bacillary angiomatosis with massive visceral lymphadenopathy. *Am J Med Sci* 306:236-240.
99. Heesemann,J., Eggers,C. & Schroder,J. (1987). Serological diagnosis of yersiniosis by immunoblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic *Yersiniae*. *Contrib Microbiol Immunol* 9:285-289.
100. Heits,F., Wiedemann,G.J. & Jelkmann,W. (1998). Vascular endothelial growth factor VEGF stimulates angiogenesis in good and bad situations. *Dtsch Med Wochenschr* 123(9):259-65.
101. Hersh,D., Monack,D.M., Smith,M.R., Ghori,N., Falkow,S. & Zychlinsky,A. (1999). The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2396-2401.
102. Hicklin,D.J. & Ellis,L.M. (2005). Role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23(5):1011-1027.

103. Hilbi,H., Moss,J.E., Hersh,D., Chen,Y., Arondel,J., Banerjee,S., Flavell, R.A., Yuan,J., Sansonetti,P.J., & Zychlinsky, A.(1998). *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* 273:32895-32900.
104. Hirschi,K.K. & D'Amore,P.A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 32:687-698.
105. Hudlicka,O. (1998). Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation? *Microcirculation* 5:7-23.
106. Hunter,T. & Pines,J. (1991). Cyclins and cancer. *Cell* 66:1071-1074.
107. Ihler,G.M. (1996). *Bartonella bacilliformis*: Dangerous pathogen slowly emerging from a deep background. *FEMS Microbiol Lett* 144:1-11.
108. Jendrossek,V., Grassme!,H., Mueller,I., Lang,F. & Gulbins,E. (2001). *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis involves mitochondria and stress-activated protein kinases. *Infect Immun* 69:2675-2683.
109. Johnson,G., Ayers,M., McClure,S.C., Richardson,S.E., & Tellier,R. (2003). Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (ribC). *J Clin Microbiol* 41:1069-1072.
110. Jonas,D., Walev,I., Berger,T., Liebetrau,M., Palmer,M. & Bhakdi,S. (1994). Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect Immun* 62:1304-1312.
111. Josko,J. & Mazurek,M. (2004). Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit* 10:RA89-RA98.
112. Kahn,J., Mehraban,F., Ingle,G., Xin,X., Bryant,J.E., Vehar,G., Schoenfeld, J., Grimaldi,C.J., Peale,F., Draksharapu,A., Lewin,D.A. & Gerritsen,M.E. (2000). Gene expression profiling in an in vitro model of angiogenesis. *Am J Pathol* 156:1887-1900.
113. Kaiser,D., Freyberg,M.A. & Friedl,P. (1997). Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 231:586-590.

114. Kampik,D., Schulte,R. & Autenrieth,I.B. (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* 68:2484-2492.
115. Karin,M. & Ben Neriah,Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.
116. Karin,M. & Lin,A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3:221-227.
117. Katoh,O., Tauchi,H., Kawaishi,K., Kimura,A. & Satow,Y. (1995). Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, *KDR*, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 55:5687-5692.
118. Kawasaki, E. (1989). Amplification of RNA sequences via complementary DNA (cDNA). *Amplifications* 3:4-6.
119. Kemper,C.A., Lombard,C.M., Deresinski,S.C. & Tompkins,L.S. (1990). Visceral bacillary epithelioid angiomatosis: possible manifestations of disseminated cat scratch disease in the immunocompromised host: a report of two cases. *Am J Med* 89:216-222.
120. Kempf,V.A.J., Schaller,M., Behrendt,S., Volkmann,B., Aepfelbacher,M., Cakman,I. & Autenrieth,I. (2000). Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cellr Microbiol* 2:431-441.
121. Kempf,V.A.J., Volkmann,B., Schaller,M., Sander,C.A., Alitalo,K., Riess,T. & Autenrieth,I.B. (2001a). Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol* 3:623-632.
122. Kempf,V.A.J., Petzold,H., & Autenrieth,I.B. (2001b). Cat scratch disease due to *Bartonella henselae* infection mimicking parotid malignancy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20:732-733.
123. Kempf,A.J.V. & Winkler,T. (2004). *Bartonella henselae* als Ursache vaskuloproliferativer Krankheitsbilder: Neue Aspekte zur Pathogenität bakterieller Infektionserreger. *Hygiene und Mikrobiologie* 8:34-39.

124. Kempf,V.A., Lebidziejewski,M., Alitalo,K., Wälzlein,J.H., Eehalt,U., Fiebig,J., Huber,S., Schütt,B., Sander,C.A., Müller,S., Grassl,G., Yazdi, A.S., Brehm,B. & Autenrieth,I.B. (2005a). Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacillary Angiomatosis. Evidence for a Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacterial Infections. *Circulation* 111:1054-1062.
125. Kempf,V.A., Schairer,A., Neumann,D., Grassl,G.A., Lauber,K., Lebidziejewski,M., Schaller,M., Kyme,P., Wesselborg,S. & Autenrieth,I.B. (2005b). *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell Microbiol* 7:91-104.
126. Kendall,R.L., Wang,G. & Thomas,K.A. (1996). Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 226:324-328.
127. Kim,K.J., Li.B., Winer.J., Armanini,M., Gillett.N., Phillips.H.S. & Ferrara,N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vitro. *Nature* 362:841-844.
128. Kirby,J.E. & Nekorchuk,D.M. (2002). *Bartonella*-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4656-4661.
129. Kitamura,K., Kangawa,K., Kawamoto,M., Ichiki,Y., Nakamura,S., Matsuo,H. & Eto,T. (1993). Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192:553-560.
130. Klement,G., Baruchel,S., Rak,J., Man,S., Clark,K., Hicklin,D.J., Bohlen,P., Kerbel,R.S. (2000). Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 105:R15-R24.
131. Klingler,K., Tchou-Wong,K.M., Brandli,O., Aston,C., Kim,R., Chi,C. & Rom,W.N. (1997). Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 65:5272-5278.
132. Klumpp,D.J., Weiser,A.C., Sengupta,S., Forrestal,S.G., Batler,R.A. & Schäffer,A.J. (2001). Uropathogenic *Escherichia coli* potentiates type 1 pilus-induced apoptosis by suppressing NF-kappaB. *Infect Immun* 69:6689-6695.
133. Knaus,U.G. & Bokoch,G.M. (1998). The p21Rac/Cdc42-activated kinases (PAKs). *Int J Biochem Cell Biol* 30:857-862.
134. Koch,A.E., Polverini,P.J., Kunkel,S.L., Harlow,L.A., DiPietro,L.A., Elnor, V.M., Elnor,S.G. & Strieter,R.M. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258:1798-1801.

135. Koch,A.E., Harlow,L.A., Haines,G.K., Amento,E.P., Unemori,E.N., Wong, W.L., Pope,R.M. & Ferrara,N. (1994). Vascular endothelial growth factor: a cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 152:4149-4156.
136. Koehler,J.E., LeBoit,P.E., Egbert,B.M. & Berger,T.G. (1988). Cutaneous vascular lesions and disseminated cat-scratch disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Ann Intern Med* 109:449-455.
137. Koehler,J.E., Quinn,F.D., Berger,T.G., LeBoit,P.E. & Tappero,J.W. (1992). Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N Engl J Med* 327:1625-1631.
138. Koehler,J.E. (1995). *Bartonella*-associated infections in HIV-infected patients. *AIDS Clinical Care* 7(12):97-102.
139. Koong,A.C., Chen,E.Y. & Giaccia,A.J. (1994). Hypoxia causes the activation of nuclear factor κ B through the phosphorylation of I κ B α on tyrosine residues. *Cancer Res* 54:1425-1430.
140. Kordick,D.L. & Breitschwerdt,E.B. (1995). Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol* 33:1655-1656.
141. Kosoy,M., Murray,M., Gilmore,R.D. Jr., Bai,Y. & Gage,K.L. (2003). *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *J Clin Microbiol* 41:645-650.
142. Kowanzetz,M. & Ferrara,N. (2006). Vascular endothelial growth factor signalling pathways: Therapeutic perspective. *Clin Cancer Res* 12(17):5018-5022
143. Kreuz,S., Siegmund,D., Rumpf,J.-J., Samel,D., Leverkus,M., Janssen,O., Häcker,G., Dittrich-Breiholz,O., Kracht,M., Scheurich,P. & Wajant,H. (2004). NF κ B activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol* 166(3):369–380.
144. Kroemer,G., Petit,P., Zamzami,N., Vayssiere,J.L. & Mignotte,B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 9:1277-1287.
145. Kroll,J. & Waltenberger,J. (1999). A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 265(3):636-9.
146. Kroll,J. & Waltenberger,J. (2000). Regulation of the endothelial function and angiogenesis by vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A). *Z Kardiol* 89(3):206-18. Review.

147. Kuwana,T. & Newmeyer,D.D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 15:691-699.
148. LeCouter,J., Kowalski,J., Foster,J., Hass,P., Zhang,Z., Dillard-Telm,L., Frantz,G., Rangell,L., DeGuzman,L., Keller,G.A., Peale,F., Gurney,A., Hillan,K.J. & Ferrara,N. (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412 :877–884.
149. Leonard,M.O., Cottell,D.C., Godson,C., Brady,H.R. & Taylor,C.T. (2003). The role of HIF-1alpha in transcriptional regulation of the proximal tubular epithelial cell response to hypoxia. *J Biol Chem* 278:40296-40304.
150. Leung,D.W., Cachianes,G., Kuang,W.-J., Goeddel,D.V. & Ferrara,N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309.
151. Li,Q., Van Antwerp,D., Mercurio, F., Lee, K. F. & Verma, I. M. (1999). Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* 284(5412):321-325.
152. Li,C.-Y., Tsai,C.-S., Chueh,S.-H., Hsu,P.-C., Wang,J.-Y., Wong,C.-S., Ho,S.-T. (2003). Dobutamin inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production and chemotaxis in human monocytes. *Anaesthesiologie and Analgesie* 97:205-209.
153. Lia,X. & Stark,G.R. (2002). NF-kappaB-dependent signalling pathways. *Exp Hematol* 30:285–296.
154. Lucey,D., Dolan,M.J., Moss,C.W., Garcia,M., Hollis,D.G., Wegner,S., Morgan,G., Almeida,R., Leong,D. & Greisen,K.S. (1992). Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. *Clin Infect Dis* 14:683-688.
155. Mallat,Z. & Tedgui,A. (2000). Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Brit J Pharmacol* 130(5):947-962
156. Margileth,A.M., Wear,D.J., Hadfield,T.L., Schlagel,C.J., Spigel,T. & Muhlbauer,J.E. (1984). Cat-scratch disease: Bacteria in skin at the primary inoculation site. *JAMA* 252:928-931.
157. Margileth,A.M. (1993): Cat scratch disease. *Adv Pediatr Infect Dis* 8:1-21.
158. Marmé,D., Martiny-Baron,G., Dreves,J. & Unger,C. (1998). Strategien zur Hemmung der Tumorangio-genese am Beispiel des VEGF/VEGF-Rezeptorsystems. *Forum DKG* 13:364-367.

159. Marvin,K.W., Keelan,J.A., Eykholt,R.L., Sato,T.A. & Mitchell,M.D. (2002). Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the human amnion and choriodecidua. *Am J Obstet Gynecol* 187:728-734.
160. Masood,R., Cai,J., Zheng,T., Smith,D.L., Naidu,Y. & Gill,P.S. (1997). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:979-984.
161. McCord,A.M., Resto-Ruiz,S.I. & Anderson,B. (2006). Autocrine role for interleukin-8 in *Bartonella henselae*-induced Angiogenesis. *Infect Immun* 74(9):5185-5190.
162. Metzen,E., Berchner-Pfannschmidt,U., Stengel,P., Marxsen,J.H., Stolze,I., Klinger,M., Huang,Q., Wotzlaw,C., Hellwig-Burgel,T., Jelkmann,W., Acker, H. & Fandrey,J. (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116:1319-1326.
163. Millauer,B., Wizigmann-Voos,S., Schnurch,H., Martinez,R., Moller,N.P., Risau,W. & Ullrich A. (1993). High affinity binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72:835-846.
164. Minchenko,A., Salceda,S., Bauer,T. & Caro,J. (1994). Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell Mol Biol Res* 40(1):35-9.
165. Monack,D.M., Raupach,B., Hromockyj,A.E. & Falkow,S. (1996). *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9833-9838.
166. Monteil,R.A., Michiels,J.F., Hofman,P., Saint,P.M., Hitzig,C., Perrin,C., & Santini,J. (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:65-71.
167. Morii,K., Tanaka,R., Washiyama,K., Kumanishi,T. & Kuwano,R. (1993). Expression of vascular endothelial growth factor in capillary hemangioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 749-755.
168. Motohashi,H., Shavit,J.A., Igarashi,K., Yamamoto,M. & Engel,J.D. (1997). The world according to Maf. *Nucleic Acids Res* 25: 2953-2959.
169. Muller,A., Gunther,D., Dux,F., Naumann,M., Meyer,T.F. & Rudel,T. (1999). Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *Embo J* 18:339-352.

170. Munshi,N., Fernandis,A.Z., Cherla,R.P., Park,I.W. & Ganju,R.K. (2002). Lipopolysaccharide-induced apoptosis of endothelial cells and its inhibition by vascular endothelial growth factor. *J Immunol.* 168:5860-5866.
171. Nakamura,S., Salahuddin,S.Z., Biberfeld,P., Ensoli,B., Markham,P.D., Wong-Staal,F. & Gallo,R.C. (1988). Kaposi's sarcoma cells: long-term culture with growth factor from retrovirus-infected CD4⁺ T cells. *Science* 242:426-430.
172. Navarre,W.W. & Zychlinsky,A. (2000). Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol* 2:265-273.
173. Negrier,S., Escudier,B., Lasset,C., Douillard,J.-Y., Savary,J., Chevreau,C., Ravaud,A., Mercatello,A., Peny,J., Mousseau,M., Philiip,T. & Tursz,T., *et al.* (1998). Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2 α , or both in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 338(18):1272-1278.
174. Neumeister,B., Faigle,M., Lauber,K., Northoff,H. & Wesselborg,S. (2002). *Legionella pneumophila* induces apoptosis via the mitochondrial death pathway. *Microbiology* 148:3639-3650.
175. Nicosia,R.F. & Villaschi,S. (1999). Autoregulation of angiogenesis by cells of the vascular wall. *Int Rev Cytol* 185:1-43.
176. Nör,J.E., Christensen,J., Mooney,D.J. & Polverini,P.J. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *AJP* 154(2):375-384.
177. O'Connor,S.P., Dorsch,M., Steigerwalt,A.G., Brenner,D.J., & Stackebrandt, E. (1991). 16S rRNA sequences of *Bartonella bacilliformis* and cat scratch disease bacillus reveal phylogenetic relationships with the alpha-2 subgroup of the class Proteobacteria. *J Clin Microbiol* 29:2144-2150.
178. Ogawa,K., Pasqualini,R., Lindberg,R.A., Kain,R., Freeman,A.L. & Pasquale,E.B. (2000). The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene* 19: 6043-6052.
179. O'Hagan,R.C., Schreiber-Agus,N., Chen,K., David,G., Engelman,J.A., Schwab,R., Alland,L., Thomson,C., Ronning,D.R., Sacchettini,J.C., Meltzer,P. & DePinho,R.A. (2000). Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis. *Nat Genet* 24:113-119.

180. Öhler,M.K., Hague,S., Rees,M.C. & Bicknell,R. (2002). Adrenomedullin promotes formation of xenografted endometrial tumors by stimulation of autocrine growth and angiogenesis. *Oncogene* 21:2815-2821.
181. Paku,S. & Paweletz,N. (1991). First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab Invest* 65:334–346.
182. Paku,S. (1998). Current Concepts of Tumor-Induced Angiogenesis. *Path Onc Res* 4(1):62-75.
183. Palmari,J., Teyssiere,N., Dussert,C. & Raoult,D. (1996). Image cytometry and topographical analysis of proliferation of endothelial cells in vitro during *Bartonella (Rochmalimaea)* infection. *Anal Cell Pathol* 11:13-30.
184. Pandey,A., Shao,H., Marks,R.M., Polverini,P.J. & Dixit,V.M. (1995). Role of B61, the ligand for the Eck receptor tyrosine kinase, in TNF-alpha-induced angiogenesis. *Science* 268:567-569.
185. Panyutich,E.A., Said,J.W. & Milles,S.A. (1998). Infection of primary dermal microvascular endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *AIDS* 12:467-472.
186. Park,J.E., Keller,G.A. & Ferrara,N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4(12):1317-1326.
187. Paul,M.A., Fleischer,A.B., Wieselthier,J.S. & White,W.L. (1994). Bacillary angiomatosis in an immunocompetent child: The first reported case. *Pediatr Dermatol* 11:338-341.
188. Pekala,P., Marlow,M., Heuvelman,D. & Connolly,D. (1990). Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor and tumor necrosis factor-alpha, but not by insulin. *J Biol Chem* 265:18051-18054.
189. Pepper,M.S., Ferrara,N., Orci,L. & Montesano,R. (1991). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181:902-906.
190. Pepper,M.S., Ferrara,N., Orci,L. & Montesano,R. (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis *in vitro*. *Am J Pathol* 145:1023-1029.
191. Peter,M.E., Heufelder,A.E. & Hengartner,M.O. (1997). Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12736-12737.

192. Raoult,D., Fournier,P.E., Drancourt,M., Marrie,T.J., Etienne,J., Cosserrat,J., Cacoub,P., Poinignon,Y., Leclercq,P. & Sefton,A.M. (1996). Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. *Ann Intern Med* 125:646-652.
193. Regnery,R.L., Anderson,B.E., Clarridge,J.E., Rodriguez,B.M., Jones,D.C. & Carr,J.H. (1992a). Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* 30:265-274.
194. Regnery,R.L., Olson,T.G., Perkins,B.A. & Bibb,W. (1992b). Serological response to *Rochalimaea henselae* antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* 339:1443-1445.
195. Relman,D.A., Loutit,J.S., Schmidt,T.M., Falkow,S. & Tompkins,L.S. (1990). The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* 323:1573-1580.
196. Resto-Ruiz,S., Schmiederer,M., Sweger,D., Newton,C., Klein,T.W., Friedman,H. & Anderson,B.E. (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.
197. Rhomberg,T.A., Karlberg,O., Mini,T., Zimny-Arndt,U., Wickenberg,U., Röttgen,M., Jungblut,P.R., Jenö,P., Andersson,G.E. & Dehio,C. (2004). Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of the bacterial pathogen *Bartonella henselae*. *Proteomics* 4:3021-3033.
198. Riess,T., Andersson,S.G., Lupas,A., Schaller,M., Schäfer,A., Kyme,P., Martin,J., Wälzlein,J.H., Eehalt,U., Lindroos,H., Schirle,M., Nordheim,A., Autenrieth,I.B. & Kempf,V.A. (2004). *Bartonella* adhesin A mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* 200:1267-1278.
199. Riess,T., Raddatz,G., Linke,D., Schäfer,A. & Kempf,V.A. (2007). Analysis of *Bartonella* adhesin A expression reveals differences between various *B. henselae* strains. *Infect Immun* 75:35-43.
200. Rodriguez-Barradas,M.C., Bandres,J.C. Hamill,R.J., Trial,J., Clarridge,III J.E., Baughn,R.E. & Rosen,D. (1995). In vitro evaluation of the role of humoral immunity against *Bartonella henselae*. *Infect Immun* 63:2367-2370.
201. Rogers,H.W., Gallery,M.P., Deck,B. & Unanue,E.R. (1996). *Listeria monocytogenes* Induces Apoptosis of Infected Hepatocytes'. *J Immunol* 156:679-684.

202. Rolain, J.M., Brouqui, P., Koehler, J.E., Maguina, C., Dolan, M.J. & Raoult, D. (2004). Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1921-1933.
203. Rosqvist, R. & Wolf-Watz, H. (1986). Virulence plasmid-associated HeLa cell induced cytotoxicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb Pathog* 1:229-240.
204. Roux, V. & Raoult, D. (1995). Inter- and intraspecies identification of *Bartonella (Rochalimaea)* species. *J Clin Microbiol* 33:1573-1579.
205. Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16:6914-6925.
206. Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbihl, R., Kohler, S., Heesemann, J. & Rouot, B. (1998). *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 187:1069-1079.
207. Ruckdeschel, K., Mannel, O., Richter, K., Jacobi, C.A., Trulzsch, K., Rouot, B. & Heesemann, J. (2001). *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J Immunol* 166:1823-1831.
208. Rudikoff, D., Phelps, R.G., Gordon, R.E., & Battone, E.J. (1989). Acquired immunodeficiency syndrome-related bacillary vascular proliferation (epithelioid angiomas): rapid response to erythromycin therapy. *Arch Dermatol* 125:706-707.
209. Salnikow, K., Blagosklonny, M.V., Ryan, H., Johnson, R. & Costa, M. (2000). Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. *Cancer Res* 60:38-41.
210. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
211. Schairer, A. (2004). Untersuchungen zur Inhibition der Apoptose von Mono Mac 6-Zellen durch *Bartonella henselae*. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Tübingen.
212. Schmid, M.C., Bisoffi, M., Wetterwald, A., Gautschi, E., Thalmann, G.N., Mitola, S., Bussolino, F. & Cecchini, M.G. (2003). Insulin-like growth factor binding protein-3 is overexpressed in endothelial cells of mouse breast tumor vessels. *Int J Cancer* 103:577-586.

213. Schmid,M.C., Schulein,R., Dehio,M., Denecker,G., Carena,I. & Dehio,C. (2004). The *VirB* type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol Microbiol* 52:81-92.
214. Schmid,M.C., Scheidegger,F., Dehio,M., Balmelle-Devaux,N., Schulein,R., Guye,P., Chennakesava,C.S., Biedermann,B. & Dehio,C. (2006). A Translocated Bacterial Protein Protects Vascular Endothelial cells from Apoptosis. *Plos Pathog* 2(11):e115:1083-1097
215. Schmidt,D., Textor,B., Pein,O.T., Licht,A.H., Andrecht,S., Sator-Schmitt,M., Fusenig,N.E., Angel,P. & Schorpp-Kistner,M. (2007). Critical role for NF- κ B-induced JunB in VEGF regulation and tumor angiogenesis. *EMBO, advance online publication 25 January 2007; doi: 10.1038/sj.emboj.7601539*
216. Schmiederer,M., Arcenas,R., Widen,R., Valkov,N., & Anderson,B. (2001). Intracellular induction of the *Bartonella henselae* virB operon by human endothelial cells. *Infect Immun* 69:6495-6502.
217. Schulein,R., Guye,P., Rhomberg,T.A., Schmid,M.C., Schroder,G., Vergunst,A.C., Carena,I. & Dehio,C. (2005). A bipartite signal mediates the transfer of typr IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:856-861.
218. Schulte,R., Wattiau,P., Hartland,E.L., Robins-Browne,R.M. & Cornelis,G.R. (1996). Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 64:2106-2113.
219. Schulte,R., Zumbihl,R., Kampik,D., Fauconnier,A. & Autenrieth,I.B. (1998). Wortmannin blocks *Yersinia* invasion-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *Med Microbiol Immunol Berl* 187:53-60.
220. Schwartz,R.A., Nychay,S.G., Janniger,C.K., Lambert,W.C.(1997). Bacillary angiomatosis: Presentation of six patients, some with unusual features. *Br J Dermatol* 136:963-964.
221. Schwartzman,W.A. (1992). Infections due to *Rochalimaea*: the expanding clinical spectrum. *Clin Infect Dis* 15:893-900.
222. Semenza,G.L. (2001). HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107: 1-3.
223. Senger,D.R., Galli,S.J., Dvorak,A.M., Perruzzi,C.A., Harvey,V.S., Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 25:983-985.

224. Shibuya,M., Ito,N. & Claesson-Welsh,L. (1999). Structure and function of vascular endothelial growth receptor-1 and -2.Curr. *Topics Microbiol Immunol* 237:59-83.
225. Shinella,R.A. & Alba Greco,M. (1990). Bacillary angiomatosis presentino as a soft-tissue tumor without skin involvement. *Hum Pathol* 21:567-569.
226. Siemeister,G., Schirner,M., Reusch,P., Barleon,B., Marme,D., Martiny-Baron,G. (1998a). An antagonistic vascular endothelial growth factor (VEGF) variant inhibits VEGF-stimulated receptor autophosphorylation and proliferation of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8):4625-9.
227. Siemeister,G., Martiny-Baron,G. & Marme,D. (1998b). The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities. *Cancer Metastasis Rev* 17(2):241-8. Review.
228. Sipkins,D.A.,Wei,X.,Wu,J.W., Runnels,J.M., Cote,D.,Means,T.K., Luster, A.D., Scadden.D.T. & Lin,C.P. (2005). In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 435(7044):969-73.
229. Slater,L.N., Welch,D.F., Hensel,D., & Coody,D.W. (1990). A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N Engl J Med* 323:1587-1593.
230. Soker,S., Takashima,S., Miao,H.Q., Neufeld,G. & Klagsbrun,M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92 :735–745.
231. Stehlik,C., de Martin,R., Kumabashiri,I., Schmid,J.A., Binder,B.R. & Lipp,J. (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med* 188:211-216.
232. Stoler,M.H., Bonfiglio,T.A., Steigbigel,R.T. & Pereira,M. (1983). An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol* 80:714-718.
233. Strieter,R.M., Kunkel,S.L., Elner,V.M., Martonyi,C.L., Koch,A.E., Polverini,P.J. & Elner,S.G. (1992). Interleukin-8: a corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol* 141:1279-1284.
234. Sukumaran,S.K., Selvaraj,S.K. & Prasadarao,N.V. (2004). Inhibition of Apoptosis by *Escherichia coli* K1 Is Accompanied by Increased Expression of BclXL and Blockade of Mitochondrial Cytochrome c Release in Macrophages. *Infection and immunity* 72(10):6012–6022.

235. Szaniawski,W.K., Don,P.C., Bitterman,S.R. & Schachner,J.R. (1990). Epitheloid angiomatosis in patients with AIDS: A report of seven cases and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 23:41-48.
236. Tang,K., Breen,E.C., Wagner,H., Brutsaert,T.D., Gassmann,M. & Wagner,P.D. (2004a). HIF and VEGF relationships in response to hypoxia and sciatic nerve stimulation in rat gastrocnemius. *Resp Phys Neurobiol* 144:71-80.
237. Tang,N., Wang,L., Esko,J., Giordano,F.J., Huang,Y., Geber,H.-P., Ferrara,N. & Johnson,R.S. (2004b). Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* 6:485-495.
238. Terman,B.I., Dougher-Vermazen,M., Carrion,M.E., Dimitrov,D., Armellino, D.C., Gospodarowicz,D. & Bohlen,P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1579-1586.
239. Tran,J., Rak,J., Sheehan,C., Saibil,S.D., LaCasse,E., Korneluk,R.G. & Kerbel,R.S. (1999). Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264:781-788.
240. Verma,A., Davis,G.E. & Ihler,G.M. (2001). Formation of stress fibers in human endothelial cells infected with *Bartonella bacilliformis* is associated with altered morphology, impaired migration and defects in cell morphogenesis. *Cell Microbiol* 3:169-180.
241. Wahl,C., Oswald,F., Simnacher,U., Weiss,S., Marre,R. & Essig,A. (2001). Survival of *Chlamydia pneumoniae*-infected Mono Mac 6 cells is dependent on NF-kappaB binding activity. *Infect Immun* 69:7039-7045.
242. Wahl,C., Maier,S., Marre,R. & Essig,A. (2003). *Chlamydia pneumoniae* induces the expression of inhibitor of apoptosis 2 (c-IAP2) in a human monocytic cell line by an NF-kappaB-dependent pathway. *Int J Med Microbiol* 293:377-381.
243. Walz,J.M., Gerhardt,H., Faigle,M., Wolburg,H. & Neumeister,B. (2000). *Legionella* species of different human prevalence induce different rates of apoptosis in human monocytic cells. *APMIS* 108:398-408.
244. Wang,G.L. & Semenza,G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270(3):1230-1237.
245. Wang,G.L., Jiang,B.H., Rue,E.A. & Semenza,G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12):5510-4.

246. Wang,C.Y., Mayo,M.W., & Baldwin,A.S. Jr. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274:784-787.
247. Wang,J., Fan,X., Lindholm,C., Bennett,M., O'Connell,J., Shanahan,F., Brooks,E.G., Reyes,V.E. & Ernst,P.B. (2000). *Helicobacter pylori* modulates lymphoepithelial cell interactions leading to epithelial cell damage through Fas/Fas ligand interactions. *Infect Immun* 68:4303-4311.
248. Wear,D.J., Margileth,A.M., Hadfield,T.L., Fischer,G.W., Schlagel,C.J., & King,F.M. (1983). Cat scratch disease: a bacterial infection. *Science* 221:403-1405.
249. Webster, G.F., Cockerell, C.J., and Friedman, K.A. (1992). The clinical spectrum of bacillary angiomatosis. *Br J Dermatol*, 126:535-541.
250. Welch,D.F., Pickett,D.A., Slater,L.N., Steigerwalt,G.& Brenner,D.J. (1992). *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angio matosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J Clin Microbiol* 30:275-280.
251. Welch,D.F., Hensel,D.M., Pickett,D.A., San Joaquin,V.H., Robinson,A., & Slater,L.N. (1993). Bacteremia due to *Rochalimaea henselae* in a child: practical identification of isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 31:2381-2386.
252. Wellmann,S., Taube,T., Paal,K., Graf,V.E., Geilen,W., Seifert,G., Eckert,C., Henze,G. & Seeger,K. (2001). Specific reverse transcription-PCR of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. *Clin Chem* 47:654-660.
253. Wiesener,M.S., Münchenhagen,P.M., Berger,I., Morgan,N.V.,Roigas,J., Schwiertz,A., Jürgensen,J.S., Gruber,G., Maxwell,P.H, Löning,S.A., Frei,U., Maher,E.R., Gröne,H.-J. & Eckardt,K.-U. (2001). Constitutive Activation of Hypoxia-inducible Genes Related to Overexpression of Hypoxia-inducible Factor-1a in Clear Cell Renal Carcinomas. *Cancer Res* 61:5215–5222.
254. Wyllie,A.H., Kerr,J.F. & Currie,A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.
255. Xia,M., Bumgarner,R.E., Lampe,M.F., Stamm,W.E. (2003). *Chlamydia trachomatis* Infection Alters Host Cell Transcription in Diverse Cellular Pathways. *The Journal of Infectious Disease* 187:424-434.
256. Yamasaki,R., Yokota,K., Okada,H., Hayashi,S., Mizuno,M., Yoshino,T., Hirai,Y., Saitou,D., Akagi,T. & Oguma,K. (2004). Immune response in *Helicobacter pylori*-induced low-grade gastric-mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *J Med Microbiol* 53:21–29.

257. Yancopoulos,G.D., Klagsbrun,M. & Folkman,J. (1998). Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 93: 661- 664.
258. Yancopoulos,G.D., Davis,S., Gale,N.W., Rudge,J.S., Wiegand,S.J. & Holash,J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242- 248.
259. Yang,J.C., Haworth,L., Sherry,R.M., Hwu,P., Schwartzenuber,D.J., Topalian,S.L., Steinberg,S.M., Chen,H.X. & Rosenberg,S.A. (2003). A randomized trial of Bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 349(5):427-434.
260. Yoshida,H., Kusaba,N., Omachi,K., Miyazaki,N., Yamawaki,M., Tsuji,Y., Nakahara,K., Sumino,M., Noudomi,M., Shimokawa,Y. & Tanikawa, K. (1996). Serological study of *Bartonella henselae* in cat scratch disease in Japan. *Microbiol Immunol* 40(9):671–673.
261. Yoshida,S., Ono,M., Shono,T., Izumi,H., Ishibashi,T., Suzuki,H. & Kuwano,M. (1997). Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 17:4015-4023.
262. Yoshimura,T. & Leonard,E. (1990). Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-2) (interleukin-8). *Am J Resp Cell Molec Biol* 2:479-486.
263. Yoshizawa,S., Tateda,K., Matsumoto,T., Gondaira,F., Miyazaki,S., Standiford,T.J. & Yamaguchi,K. (2005). *Legionella pneumophila* Evades Gamma Interferon-Mediated Growth Suppression through Interleukin-10 Induction in Bone Marrow-Derived Macrophages. *Infect Immun* 73(5): 2709–2717.
264. Yuan,J. & Yankner,B.A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
265. Zachary, I. (2003). VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. In: Palmer,T. (ed.)(2003). Integration of Mitogenic and Migratory Signals from G-Protein-Coupled Receptors and Tyrosine Kinases. Hormone Group Colloquium. 679th Meeting of the Biochemical Society held at the University of Essex, Colchester.
266. Zähringer,U., Lindner,B., Knirel,Y.A., van den Akker,W.M., Hiestand,R., Heine,H. & Dehio,C. (2004). Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. *J Biol Chem* 279(20):21046-54.

267. Zangwill, K.M., Hamilton, D.H., Perkins, B.A., Regnery, R.L., Plikaytis, B.D., Hadler, J.L., Cartter, M.L. & Wenger, J.D. (1993). Cat scratch disease in Connecticut- Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. *N Engl J Med* 329:8-13.
268. Zeaiter, Z., Fournier, P.-E. & Raoult, D. (2002). Genomic variation of *Bartonella henselae* strains detected in lymph nodes of patients with cat scratch disease. *J Clin Microbiol* 40(3):1023-1030.
269. Zeaiter, Z., Fournier, P.-E., Greub, G. & Raoult, D. (2003). Diagnosis of *Bartonella* Endocarditis by a Real-Time Nested PCR Assay Using Serum. *J Clin Microbiol* 41(3):919-925.
270. Zeng, H., Dvorak, H.F. & Mukhopadhyay, D. (2001). Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 276:26969- 26979.
271. Ziegler-Heitbrock, H.W., Sternsdorf, T., Liese, J., Belohradsky, B., Weber, C., Wedel, A., Schreck, R., Bauerle, P. & Strobel, M. (1993). Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-kappa B mobilization and TNF production in human monocytes. *J Immunol* 151:6986-6993.
272. Zimmermann, R., Kempf, V.A., Schiltz, E., Oberle, K. & Sander, A. (2003). Hemin binding, functional expression, and complementation analysis of Pap 31 from *Bartonella henselae*. *J Bacteriol* 185:1739-1744.
273. Zink, S.D., Pedersen, L., Cianciotto, N.P. & Kwak, Y.A. (2002). The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect Immun* 70:1657-1663.
274. Zychlinsky, A., Prevost, M.C., & Sansonetti, P.J. (1992). *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358:167-169.

7. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ad	lat.: bis
ADM	Adrenomedullin
AIDS	<i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
Ak	Antikörper
Akt	Protein Kinase B
Ang2	Angiopoetin 2
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
B.	<i>Bartonella</i>
B.h.	<i>Bartonella henselae</i>
BA	bazilläre Angiomatose
BadA	<i>Bartonella</i> Adhäsion A
Bax	<i>Bcl-2 associated X-protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bep	<i>Bartonella</i> -transloziertes Effektorprotein
bFGF	<i>basic Fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C.	<i>Chlamydia</i>
C3	Caspase 3
Ca	Kalzium
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>
CCL2	CC-Chemokinligand, auch β -Chemokinligand
CCNG2	Zyclin G2
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA (complementary desoxyribonucleic acid)</i>
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis</i>
Cl	Chlorid
cm ²	Quadrat Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Zyklooxygenase 2
cpm	<i>counts per minute</i> (Impulse pro Minute)
CSD	<i>Cat Scratch disease</i> , Katzenkratzkrankheit
CXCL	CXC-Chemokinligand, auch α -Chemokinligand
d	Tag

DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole-2HCl
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds-cDNA	<i>double stranded</i> cDNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Einheiten
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EFNA1	Ephrin A1
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENO2	Enolase 2
EPO	Erythropoetin
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
E-Sele	E-Selektin
ET-2	Endothelin-2
EZ	Endothelzellen
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	<i>fetal calf serum</i> (FKS: fötales Kälberserum)
Fe ²⁺	Eisen
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FIH	<i>factor inhibiting HIF</i>
Flk-1-Rezeptor	<i>murin: fetal liver kinase</i> , muriner VEGF-Rezeptor 2
Flt-1	fms-like-tyrosine kinase -1
Flt-4	VEGF-Rezeptor-3
Fur	<i>ferric uptake regulation protein</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase
Gln	Glutamin
Glut 1(3)	Glucose transporter 1 (3)
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O bidest.	zweifach destilliertes Wasser

H ₂ O dest.	einfach destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HDMEC	<i>human dermale microvasculare endothelial cell</i>
HHV	Humanes Herpes Virus
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor-1</i> (Hypoxie-induzierbarer Faktor-1)
HIV	Humanes Immunschwäche Virus
HK2	Hexokinase 2
HREs	<i>hypoxia response elements</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
Htr-A	<i>high temperature requirement A</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i> (HUVE-Zellen)
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i>
IFA	Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
IGFBP-3	<i>insulin-like growth factor binding protein-3</i>
IL-1 α	Interleukin 1 alpha
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
iNOS	Hypoxie-induzierbare Form der NO-Synthase
inv	Invasin
IPTG	Isopropyl- α -D-Thiogalactopyranosid
I κ B	<i>Inhibitor κB</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Jun	<i>v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog</i>
JunB	<i>jun B proto-oncogene</i>
K	Kontrolle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KDR	<i>kinase insert domain containing receptor (human)</i>
KKK	Katzenkratzkrankheit
KS	Kaposi Sarkom
l	Liter
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromol
M	Mol (mol/l)
mA	Milliampère

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mb	<i>megabases</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i> (entspricht nach neuer Nomenklatur CCL2)
MEK	<i>mitogen-activated ERK-activating kinase</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MIP-2	Makrophagen entzündliches Protein 2
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
Na	Natrium
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa-B / <i>nuclear factor-κB</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NP -1	Neuropilin-1
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ODD	sauerstoff-abhängige Degradierungs-Domäne
OMP	<i>outer membrane protein</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
P/S	Penicillin / Streptomycin
p100	Precursor-Protein von p50 (IκB-δ)
p105	Precursor-Protein von p52 (IκB-γ)
p50	NF-κB1, Untereinheit von NF-κB, (bildet mit p52 RelA)
p52	NF-κB2, Untereinheit von NF-κB, (bildet mit p50 RelA)
p65	Untereinheit von NF-κB; entspricht RelA; proteolytischer Komplex
PA-1	Plasminogenaktivator-1
Pap31	Phagenassoziiertes Protein 31 (Hämin-Bindeprotein)
PAS	<i>basic helix-loop-helix-Per/ARNT/sim</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>personal computer</i>
PCL-γ	Phospholipase C-gamma
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat

pg	Pikogramm
PH	Peliosis Hepatis
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PHD1, 2, 3	Prolyl-4-Hydroxylasen 1,2,3
PI3-Kinase, PI3K	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
PIGF	placenta growth factor
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12 Myristat-13-Azetat
PMN	polymorphkernige Neutrophile
PMS	Phenazin-Methosulfat
PMSF	Phenylmethansulfon-Säurefluorid
PNPP	P-Nitrophenyl-Phosphat
pVHL	von-Hippel-Lindau-Tumor Supressor
Rac	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Raf	<i>Ras regulated serine/threonine protein kinase</i>
Ras	<i>Ras superfamily of small guanosin triphosphatases</i>
RelB	Hetreodimer aus p50 und p52 (<i>nuclearfactor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3</i>)
rh	<i>recombinant human</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rotations/rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RT	reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
rt	<i>real time</i>
s	Sekunde
S.	<i>Salmonella</i>
SELE	E-Selektin
SI	Stimulationsindex
spp.	<i>spezies</i> (lat.: Arten)
STC-2	Stanniocalcin-2
subsp.	<i>Subspezies</i> (lat. Unterarten)
TISS	Typ II Sekretionssystem
TIISS	Typ III Sekretionssystem
TIVSS	Typ IV Sekretionssystem
TAA	<i>trimeric autotransporter adhesin</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF	<i>transforming growth factor</i>

TM	TaqMan-Sonde
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
tPA und uPA	Plasminogen-Aktivator
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin-Isocyanat
Trw	<i>Transfer proteine</i> (Membranprotein, TIVSS)
TSH	Thyreoideastimulierendes Hormon
U	Umdrehung
u	units
UPEC	<i>Uropathogenic Escherichia coli</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR, VEGF-R	VEGF-Rezeptoren
VirB/D4	Virulenzproteine, -gene B und D4, die zusammen einen Transmembrankomplex / ein Typ-4-Sekretionssystem bilden
VLA-4	<i>very late antigene-4</i>
VPF	<i>vascular permeability factor</i>
WT	Wildtyp
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	Yersinia Adhäsion A
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Anhang

Tab. 28: Induzierte Gene in HUVE-Zellen; 6 h nach *B. henselae*-Infektion

Nr.	Gen (hochregulierte Gene)	Abkürzung	Induktion Array ¹	Biologische Funktion ²	Genbank Zugangszahl
1.	granulocyte-macrophage colony stimulating factor 2	GM-CSF, CSF2	18,51	Proinflammatorisch	NM_000758
2.	NGFI-A binding protein (EGR1 binding protein 2)	NAB2	13,83	Regulation der Transkription	NM_005967
3.	chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2, MCP1	11,63	Proinflammatorisch, antiapoptotisch	NM_002982
4.	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3, GRO3	9,71	Proinflammatorisch, Immunantwort	NM_002090
5.	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1, GRO1	9,58	Proinflammatorisch, Immunantwort	NM_001511
6.	zinc finger protein 36	ZFP36	8,34	mRNA Katabolismus	NM_003407
7.	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2, GRO2	7,41	Proinflammatorisch, Immunantwort	NM_002089
8.	selectin E	SELE	5,9	Inflammation, vermittelt Zelladhäsion	NM_000450
9.	angiopoietin-like 4	ANGPTL4	5,28	Angioproliferativ, anti-apoptotisch	NM_016109
10.	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	NR4A3	4,89	Regulation der Transkription	NM_006981 NM_173200
11.	Interleukin 8	IL-8	4,59	Proinflammatorisch, angioproliferativ, Immunantwort	NM_000584
12.	pleckstrin homology-like domain family A, member 1	PHLDA1	4,38	Antikarzinogen	NM_007350
13.	fragile X mental retardation autosomal homolog 2	FXR2	4,23	Fragiles X Syndrom	NM_004860
14.	intracellular adhesion molecule 1	ICAM 1	4,14	Zelladhäsion	NM_000201
15.	nuclear factor of kappa-light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NF-KBIA	4,11	NF-κB Inhibitor	NM_020529
16.	FK506 binding protein 8	FKBP8	4,0	Signaltransduktion, antiapoptotisch	NM_012181
17.	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	TNFAIP3	3,92	Regulation der Transkription, antiapoptotisch	NM_006290

18.	KIAA0963 protein	KIAA0963	3,78	Unbekannt		
19.	hypothetical protein FLJ23231	FLJ23231	3,53	Unbekannt		NM_025079
20.	solute carrier family 7, member 5	SLC7A5	3,39	Metabolismus, Aminosäuretransport		NM_003486 NM_015923
21.	growth arrest and DNA-damage inducible beta	GADD45B	3,36	Proapoptotisch, Signaltransduktion		NM_015675
22.	potassium voltage-gated channel, shaw-related subfamily, member 4	KCNC4	3,25	Metabolismus, Kaliumtransport		NM_004978 NM_153763
23.	dual specificity phosphatase 1	DUSP1	3,2	Stressantwort, Signaltransduktion		NM_004417
24.	spermatogenesis associated 2	SPATA2	3,14	Spermatogenese		NM_006038
25.	hepatitis delta antigen-interacting protein A	DIPA	3,14	Regulation der Hepatitis delta Virus Replikation		NM_005438
26.	biglycan	BGN	3,1	Tumorsuppressor		NM_001711
27.	B-cell CLL/lymphoma 3	BCL3	2,95	Regulierung der NF- κ B-Aktivität		NM_005178
28.	jun B proto-oncogene	JUNB	2,95	Transkription vom Pol2 Promotor, AP-1 Untereinheit		NM_002229
29.	high mobility group AT-hook 1	HMG1	2,85	Regulation der Transkription		NM_002131
30.	CASK interacting protein 2	CASKIN2	2,79	Signalmolekül, Adapterprotein		NM_020753
31.	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	2,71	Transkription vom Pol2 Promotor, AP-1 Untereinheit		NM_005252
32.	vascular endothelial growth factor	VEGF	2,69	Angiopro proliferativ		NM_003376
33.	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFA	2,69	Wachstumsfaktor		NM_002607 NM_033023
34.	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	CYP1A1	2,51	Metabolismus exogener/endogener Chemikalien, Elektronentransport		NM_000499
35.	dual specificity phosphatase 6	DUSP6	2,48	Signaltransduktion		NM_001946
36.	hypothetical protein FLJ23042	FLJ23042	2,43	Unbekannt		NM_002859
37.	heat shock 70kDA protein 1A	HSPA1A	2,43	Stressantwort		NM_005345
38.	early growth response 1	EGR1	2,41	Regulation der Transkription		NM_001964
39.	cytokine-inducible kinase	CNK	2,38	Signaltransduktion		NM_004073
40.	insulin induced gene 1	INSIG1	2,36	Metabolismus, Kontrolle des Cholesterin- und Fettsäurestoffwechsels		NM_005542 NM_198336

41.	interferon regulatory factor 1	IRF1	2,35	Transkription vom Pol2 Promotor, Immunantwort	NM_002198
42.	VCY2 interacting protein 1	VCY2IP1	2,33	Spermatogenese	NM_018174
43.	Adrenomedullin	ADM	2,31	angioproliferativ	NM_001124
44.	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	2,3	Transkription vom Pol2 Promotor	NM_005194
45.	solute carrier family 2, member 3	SLC2A3,	2,2	Glukosetransport	NM_006931
46.	MYC-associated zinc finger protein	MAZ	2,19	Transkription vom Pol2 Promotor	NM_002383
47.	TGFB inducible early growth response	TIEG	2,16	Herabregulierung der Transkription vom Pol2 Promotor	NM_005655
48.	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	JUN	2,11	Regulation der Transkription	NM_002228
49.	HIF-1responsive RTP801	RTP801	2,07	Antiapoptotisch	NM_019058
50.	sprouty homolog 2	SPRY2	2,06	Regulation der Signaltransduktion	NM_005842
51.	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDI	2,03	Rho Protein Signal Transduktion	NM_004309
52.	jun D proto-oncogene	JUND	2,01	Transkription vom Pol2 Promotor	NM_005354
53.	tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-mono-oxygenase activation protein, epsilon polypeptide	YWHAE	1,99	Signaltransduktion	NM_006761
54.	core promoter element binding protein	COPEB	1,99	Regulation der Transkription	NM_001300
55.	ADP-ribosylation factor-like 7	ARL7	1,99	Signaltransduktion	NM_005737
56.	prostaglandin-endoperoxide synthase2	PTGS2, COX2	1,97	Regulation der Inflammation	NM_000963
57.	vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	1,97	Zelladhäsion	NM_080682
58.	dual specificity phosphatase 5	DUSP5	1,92	Stressantwort, Signaltransduktion	NM_004419
59.	nucleobindin 1	NUCB1	1,92	Ca2+ Bindeprotein	NM_006184
60.	bone morphogenetic protein 2	BMP2	1,91	Wachstumsfaktor, Signaltransduktion	NM_001200
61.	serine proteinase inhibitor, clade B, member 2	SERPIN2	1,89	Antiapoptotisch	NM_002575
62.	basic helix-loop-helix domain containing, classB	BHLHB2	1,87	Regulation der Transkription	NM_003670
63.	Interleukin 6	IL-6	1,83	Inflammation, Immunantwort	NM_000600
64.	heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan)	HSPG2	1,83	Proangiogenetisch	NM_005529

65.	protein tyrosine phosphatase receptor type, O/// protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	PTPRO	1,8	Elektronentransport	NM_001807
66.	inhibitor of DNA binding 2 dominant negative helix- loop-helix protein	ID2	1,79	Regulation von Transkriptionsfaktoren	NM_002166
67.	zyxin	ZYX	1,79	Zelladhäsion, Signaltransduktion	NM_003461
68.	protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A	PPP1R15A	1,77	Apoptose	NM_014330
69.	tumor-associated calcium signal transducer 2	TACSTD2	1,74	Signaltransduktion	NM_002353
Nr.	Gen (herabregulierte Gene)	Abkürzung	Induktion Array¹	Biologische Funktion²	Genbank Zugangs- zahl
70.	chromosome 6 open reading frame 62	C6orf62	0,58	Unbekannt	-
71.	thioredoxin interacting protein	TXNIP	0,55	Unbekannt	NM_006472
72.	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to 1; cyclin D-related	CBFA2T1	0,49	Karzinogenese	NM_004349 NM_175634 NM_175635
73.	ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	ATP6V1A	0,41	Protonentransport	NM_001690
74.	phospholipase C-like 2	PLCL2	0,38	Lipidmetabolismus	NM_015184
75.	hypothetical protein FLJ11336	FLJ11336	0,35	Unbekannt	NM_018393

¹ Die Analyse von zwei voneinander unabhängigen Datensets wurde auf dem Affymetrix Microarray suite 5.0 und Affymetrix Data Mining Tool 3.0 durchgeführt. Es wurde der Genarray Typ U133A verwendet.

² Die biologischen Funktionen wurden der Datenbank Gene ontology (<http://www.geneontology.org>) entnommen.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Volkhard Kempf für seine ausgezeichnete und anhaltende Betreuung, seine zahlreichen Ideen und Motivation sowie für seine Unterstützung bei der Beantwortung meiner Fragen und für die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Für die ausgezeichnete Kooperationsbereitschaft in diesem Projekt möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Autenrieth, Herrn Prof. Dr. Alitalo, Herrn Dr. Bonin und bei Frau Dr. Lebidziejewski bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an alle Mitarbeiter für die hilfreichen Informationen, Diskussionen, das Korrekturlesen sowie für die nette Arbeitsatmosphäre, die die Umsetzung der Arbeit wesentlich erleichtert haben.

Ich möchte mich sehr bei Dr. Tanja Riess, Andrea Schäfer, Diana Neumann und Joo-Hee Wälzlein für ihre Diskussionsbereitschaft, ihre Denkanstöße und ihre Hilfe bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Lydia Häussermann, Dr. Tanja Mändle, Dr. Urs Eehalt und Dr. Annette Schairer, die mich mit zahlreichen Tipps immer wieder unterstützten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die stets für mich da war und mich und diese Arbeit unterstützt hat. Mein größter Dank geht allerdings an meinen Freund Alexander, der mir stets zur Seite stand, für sein Korrekturlesen sowie seinen Rückhalt und seine unermüdliche Unterstützung, damit diese Arbeit erfolgreich verläuft.

10. Publikationen

Publikationen, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

Kempf, V.A., Lebedziejewski, M., Alitalo, K., Wälzlein, J.H., Eehalt, U., Fiebig, J., Huber, S., Schütt, B., Sander, C.A., Müller, S., Grassl, G., Yazdi, A.S., Brehm, B. & Autenrieth, I.B. (2005). Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacillary Angiomatosis. Evidence for a Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacterial Infections. *Circulation* 111:1054-1062.

Kongressbeiträge, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

***B. henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells.** Schairer, A., Fiebig, J., Grassl, G.A., Autenrieth, I.B, Kempf, V.A.J.; 54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Heidelberg, 06.-10. Oktober 2002

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jeannette Fiebig
Geburtsdatum	14.08.1979
Geburtsort	Erfurt
Eltern	Gabriele Fiebig, Helmut Bärwolf

Schulbildung

1986 - 1990	Rosa Luxemburg Schule Erfurt
1990 - 1992	Gutenberg-Gymnasium Erfurt
1992 - 1998	Albert-Schweitzer-Gymnasium Erfurt / Spezialschulteil mathematisch-naturwissenschaftlicher Richtung

Studium

Ab April 1999	Studium der Humanmedizin an der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen
März 2001	Physikum
März 2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2006	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2006 - März 2007	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen
08. Mai 2007	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen und Ärztliche Praktika

11. März - 10. April 2002	Praxisfamulatur; Neurologie und Psychiatrie
01. März - 31. März 2004	Praxisfamulatur; Neurologie und Psychotherapie
20. Aug. - 10. Okt. 2004	Krankenhausfamulatur; Allgemeine Psychiatrie; Universitätsklinikum Tübingen
31. Januar - 11. März 2005	Auslandsfamulatur, Philippinen; Allgemeine Innere Medizin (mit Schwerpunkt Tropenmedizin), LSU-infirmery, Visca, Baybay, Leyte, Philippines
01. - 31. August 2005	Krankenhausfamulatur; Innere Medizin mit Schwerpunkt: Tropenmedizin, Paul-Lechler-Krankenhaus, Tübingen
15. Jan - 17. Juli 2008	Ärztliches Praktikum mit Schwerpunkt Tropenmedizin / Infektiologie in den Abteilungen: Internal Medicine, Pediatrics, Emergency Room im Western Leyte Provincial Hospital, Baybay City, Leyte, Philippinen
Februar - Sept. 2008	Durchführung von „Medical Care Service“ in marginalen Regionen von Leyte, Philippinen sowie Teilnahme an medizinischen Hilfsprogrammen wie „Handog Puso - Minor Surgery Program“; „General Check-Up for the Rural Population“ in Zusammenarbeit mit der jeweiligen Rural Health Unit (RHU)“, etc. in diversen Regionen auf Leyte, Philippinen

Promotionsarbeit

Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Thema: „Die Pathogenität von *Bartonella henselae* im Kontext von Angiogenese und Apoptose“, betreut durch Prof. Dr. V.A.J. Kempf (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. I.B. Autenrieth)