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

Funktionelle Analyse von *Bartonella* Adhäsin A

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Carola Liane Wagner

aus
Wertingen

2009

Dekan:	Professor Dr. med. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. V. A. J. Kempf
2. Berichterstatter:	Professor Dr. rer. nat. S. Wesselborg

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

Sir Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Die Gattung *Bartonella* 1

1.1.1 Durch *Bartonella* spp. verursachte Erkrankungen 1

1.1.1.1 *B. bacilliformis*-Infektionen 2

1.1.1.2 *B. quintana*-Infektionen 2

1.1.1.3 Das klinische Bild der Infektion mit *B. henselae* 3

1.1.1.3.1 Katzenkratzkrankheit 3

1.1.1.3.2 Vaskuloproliferative Krankheitsbilder 4

1.1.2 Pathogenitätsfaktoren der *Bartonella* spp. 5

1.1.2.1 *Bartonella* Adhäsin A 6

1.2 Angiogenese 9

1.2.1 Mechanismen und Regulation der Angiogenese 10

1.2.1.1 Der Transkriptionsfaktor *Hypoxia inducible factor* (HIF)-1 11

1.2.1.2 Der Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor-κB (NF-κB) 12

1.3 Bakteriell induzierte Angiogenese 13

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit 16

2 Material und Methoden 19

2.1 Material 19

2.1.1 Geräte 19

2.1.2 Materialien 20

2.1.3 Chemikalien 20

2.1.4 Kits 22

2.1.5 Antibiotika 22

2.1.6 Größenstandards 22

2.1.7 Enzyme 22

2.1.8 Zytokine 22

2.1.9 Antikörper 23

2.1.10 Oligonukleotide 24

2.1.11 Bakterienstämme und Bakterienkulturmedien 25

2.1.12 Zellkulturmedien 26
2.1.13 Puffer und Lösungen 26
2.2 Methoden 30
2.2.1 Bakterien 30
2.2.1.1 Bakterienanzucht und Kultivierung für *in vitro* Experimente 30
2.2.1.2 Herstellung von Bakterienstocks 30
2.2.1.3 Präparation von *outer membrane proteins* (OMPs) 30
2.2.1.4 *B. henselae* Lipopolysaccharid 31
2.2.2 Zellkultur 32
2.2.2.1 Kultivierung 32
2.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl 32
2.2.2.3 Infektionsexperimente 33
2.2.2.4 Infektionsexperimente zum Nachweis der Adhärenz von *B. henselae* 33
2.2.3 Analyse der Funktion von BadA-Domänen 34
2.2.3.1 Zellkulturexperimente mit BadA-Domänen 34
2.2.3.2 Generierung eines $BadA_{Kopf}$-spezifischen Antikörpers 35
2.2.4 Färbungen 35
2.2.4.1 Doppelimmunfluoreszenz (DIF) 35
2.2.5 Proteinbiochemische Methoden 37
2.2.5.1 Präparation von Proteinextrakten für Western Blot mit Laemmli-Puffer 37
2.2.5.2 Präparation von Proteinextrakten zur Bestimmung von HIF-1α 37
2.2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford 38
2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 38
2.2.5.5 Western Blot 39
2.2.6 Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen 40
2.2.6.1 Gewinnung von Zellkulturüberständen 40
2.2.6.2 ELISA 41
2.2.6.2.1 IL-8 ELISA 41
2.2.6.2.2 VEGF-ELISA 42
2.2.7 Molekulargenetische Methoden 42

2.2.7.1 RNA-Isolierung 42
2.2.7.2 Quantifizierung der RNA 43
2.2.7.3 Reverse-Transkriptase Reaktion (RT-PCR) 43
2.2.7.4 Polymerase Kettenreaktion 44
2.2.7.5 Gelelektrophorese der PCR-Produkte 45
2.2.7.6 Quantitative PCR mittels Light-Cycler 46
2.2.8 Infektionsserologische Methoden zum Nachweis von *B. henselae*-Antikörpern in Patientenseren 49
2.2.8.1 IFT zum Nachweis einer *B. henselae* Infektion 50
2.2.8.2 Western Blot zum Nachweis einer *B. henselae* Infektion 51
2.2.9 Statistik 51

3 Ergebnisse 53

3.1 BadA-abhängige Interaktion von *B. henselae* mit humanen Endothelzellen 53
3.1.1 BadA-abhängige Adhärenz an und Invasion in ECs 53
3.1.2 Nachweis der BadA-abhängigen Aktivierung von HIF-1 in ECs 54
3.1.3 Analyse der BadA-abhängigen Geninduktion in ECs 54
3.1.4 Nachweis der BadA-abhängigen Aktivierung von p38 MAP-Kinase in ECs 56
3.1.5 *B. henselae*-OMPs induzierte Zytokinsekretion in Endothel- und Epithelzellen 57
3.1.6 Einfluss von *B. henselae* Lipopolysaccharid auf die Induktion einer proinflammatorischen Wirtszellantwort in ECs 59
3.2 Funktionelle Analyse der $BadA_{Kopf}$- und $BadA_{Stiel}$-Domäne 61
3.2.1 Nachweis der Adhärenz der $BadA_{Kopf}$-Domäne an Endothel- und Epithelzellen 62
3.2.2 Quantifizierung der Adhärenz von *B. henselae* an Endothel- und Epithelzellen 63
3.2.3 Nachweis der HIF-1-Aktivierung durch die $BadA_{Kopf}$-Domäne 64
3.2.4 Nachweis der $BadA_{Kopf}$-induzierten Zytokinsekretion 64
3.2.5 Funktionelle Analyse der $BadA_{Stiel}$-Domäne 66

3.3 Evaluation des Immunoblots als serodiagnostische Methode zum Nachweis von *Bartonella*-Infektionen....67
3.3.1 Prinzip der Analyse der eingesetzten Patientenseren im BadA-Immunoblot....67
3.3.2 Analyse der Nachweisbarkeit von anti-BadA-Antikörpern im Immunoblot....71
3.3.3 Analyse weiterer Proteinbanden auf ihre Tauglichkeit als diagnostischer Marker im Immunoblot....74
3.3.4 Analyse der Kreuzreaktivität von *Yersinia*-Antikörpern mit BadA....76
3.3.5 Analyse der $BadA_{Kopf}$-Domäne auf ihre Tauglichkeit als diagnostischer Marker....77

4 Diskussion....79

4.1 Aktivierung einer proangiogenetischen und proinflammatorischen Wirtszellantwort in ECs nach Infektion mit *B. henselae*....81
4.1.1 Analyse der BadA-Abhängigkeit der Endothelzellantwort....81
4.1.2 Bedeutung von *B. henselae* OMPs im Infektionsverlauf....83
4.1.3 Bedeutung von Lipopolysacchariden für die Induktion einer inflammatorischen Wirtszellantwort....84
4.2 BadA – Nur Adhäsin oder Induktor einer proangiogenetischen Wirtszellantwort?....86
4.3 BadA – ein neuer serodiagnostischer Marker im Verlauf von *Bartonella*-Infektionen?....91
4.4 Ausblick: BadA in Diagnostik und Therapie....95

5 Zusammenfassung....97

6 Literaturverzeichnis....99

7 Abkürzungen....113

8 Anhang....117

9 Publikationen....123

10 Danksagung 125

11 Lebenslauf 127

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Bartonella*

Bei *Bartonella* spp. handelt es sich um aerobe, Gram-negative, fakultativ intrazellulär wachsende Stäbchenbakterien. *Bartonella* spp. gehören zur Klasse der α2-Proteobakterien und sind phylogenetisch eng mit den Gattungen *Brucella*, *Agrobacterium* und *Rhizobium* verwandt (108). Bis 1993 war *B. bacilliformis* die einzige Spezies der Gattung *Bartonella,* dann wurden aufgrund molekulargenetischer Analysen die Gattungen *Rochalimaea* und *Grahamella* in die Gattung *Bartonella* eingegliedert (15,17). Mittlerweile sind 20 Arten dieser Gattung bekannt, von denen 9 als humanpathogen beschrieben worden sind (43): *B. bacilliformis, B. quintana, B. henselae, B. clarridgeiae, B. elizabethae, B. grahamii, B. vinsonii* und *B. washoensis. B. henselae, B. quintana* und *B. bacilliformis* lösen beim Menschen angioproliferative Krankheitsbilder aus und stellen die einzigen bakteriellen Infektionserreger mit dieser Fähigkeit dar.

1.1.1 Durch *Bartonella* spp. verursachte Erkrankungen

Infektionen des Menschen mit *Bartonella* spp. sind häufige Erkrankungen. Die Seroprävalenz von anti-*Bartonella*-Antikörpern liegt (je nach Bewertungsgrenze und geographischer Lage) bei ~5-30% der gesunden Blutspender (1), ca. 13% der unklaren Halslymphknotenschwellungen sind durch *Bartonella*-Infektionen bedingt (130).

Bartonella spp. sind Säugetier-Pathogene, die ein enges Wirtsspektrum aufweisen und nur an einen oder wenige Säugetierwirte (Reservoirwirte) angepasst sind. Die Übertragung erfolgt dabei hauptsächlich über blutsaugende Arthropoden (z. B. Flöhe, Zecken, Läuse). Während die Infektion eines Reservoirwirts zu einer langanhaltenden intraerythrozytären Bakteriämie führt, kommt es bei der Infektion von Fehlwirten zu verschiedensten klinischen Manifestationen (75).

Infektionen mit humanpathogenen *Bartonella* spp. können als akutes oder chronisches Krankheitsgeschehen verlaufen (37,47). Der Mensch ist der einzige Reservoirwirt von *B. baciliformis* und *B. quintana,* den Erregern der Carrion'schen

Krankheit [*B. bacilliformis*, (10)] und des Fünftagefiebers [*B. quintana* (12)], pathogenetisch kommt es dabei zu einer intraerythrozytären Bakteriämie und zu einer Assoziation der Erreger mit Endothelzellen (44). Der natürliche Wirt von *B. henselae* hingegen ist die Katze, in der der Erreger eine langandauernde Bakteriämie verursacht, die typischerweise asymptomatisch verläuft (90). Für den Verlauf einer *B. henselae*-Infektion beim Menschen, bei dem es sich um einen Fehlwirt von *B. henselae* handelt, ist der Immunstatus des Erkrankten entscheidend. Während es beim Immunkompetenten meist zu einer Katzenkratzkrankheit (KKK) kommt (42), treten beim Immunsupprimierten vielmehr vaskuloproliferative Läsionen auf (45).

1.1.1.1 *B. bacilliformis*-Infektionen

B. bacilliformis wird durch die Sandfliege *Lutzomyia verrucarum* auf den Menschen übertragen (5) und verursacht die Carrion'sche Krankheit, die endemisch nur in den Anden Südamerikas vorkommt. Es handelt sich hierbei um eine zweiphasige Erkrankung, bei der es zunächst zu einer nach 2-6 wöchiger Inkubation auftretenden, akuten hämolytischen Anämie kommt, die von intermittierendem Fieber begleitet wird (Oroya Fieber) und eine hohe Letalität aufweist. Die zweiten Phase ist durch eine chronisch-lokalisierte Manifestation (Verruga peruana) charakterisiert, die nach Wochen bis Monaten auftritt und durch das Vorkommen von noduloverrukösen, teleangiektatischen Papeln an Gesicht und Extremitäten gekennzeichnet ist (9,104).

1.1.1.2 *B. quintana*-Infektionen

Das Fünftagefieber wird durch *B. quintana* verursacht und von Mensch zu Mensch durch die Kleiderlaus *Pediculus humanus corporis* übertragen (11). Dabei treten plötzliche Kopfschmerzen, eine aseptische Meningitis, persistierendes Fieber sowie weitere unspezifische Symptome auf. Die Krankheit kam epidemisch vor allem während der beiden Weltkriege vor (109) und rückte danach etwas in den Hintergrund des Interesses. Heute treten *B. quintana*-Infektionen vor allem bei Menschen auf, die unter schlechten hygienischen Verhältnissen leben (19,74,151). Die klinischen Manifestationen der *B. quintana*-Infektion sind neben dem Fünftagefieber auch Endocarditis und vasculoproliferative Krankheiten wie die Bazilläre Angiomatose.

1.1.1.3 Das klinische Bild der Infektion mit *B. henselae*

1.1.1.3.1 Katzenkratzkrankheit

Eine Infektion mit *B. henselae* manifestiert sich beim Immunkompetenten als Katzenkratzkrankheit (KKK), beim Immunsupprimierten als Bazilläre Angiomatose (BA) oder Peliosis hepatis (PH). Schwerwiegende Manifestationen einer *B. henselae*-Infektion kommen vor allem bei Patienten mit eingeschränkter zellulärer Immunität vor (18,91,126,152), was wahrscheinlich auf die Fähigkeit des Erregers, intrazellulär zu persistieren, zurückzuführen ist (18). Bei der KKK handelt es sich um eine Erkrankung, die durch Infektion eines Fehlwirts (Mensch) entsteht, während der natürliche Wirt von *B. henselae* die Katze ist (134). Die Übertragung von der Katze auf den Menschen findet durch Kratz- und Bissverletzungen oder indirekt über den Katzenfloh *Ctenocephalides felis* statt (35,36). An der Stelle der Hautläsion bildet sich typischerweise eine Papel oder Pustel aus, nach einer Latenzzeit von 7-40 d kann eine lokale Lympadenopathie folgen (12).

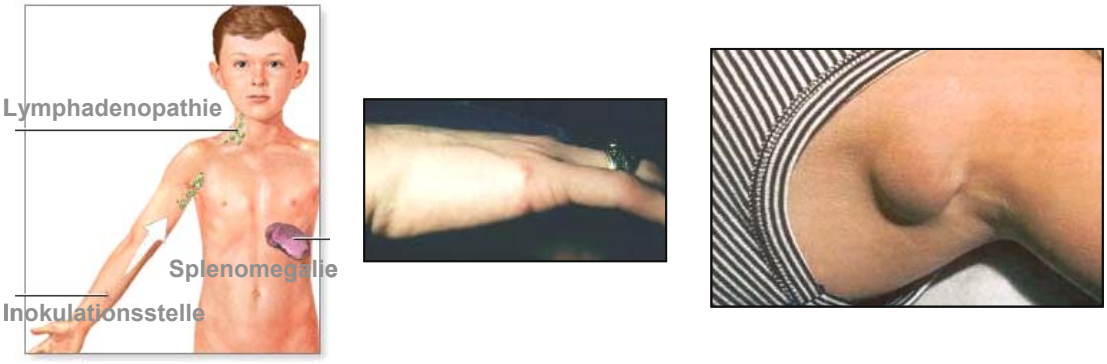


Abb. 1: Klinische Manifestation der Katzenkratzkrankheit. links: schematische Darstellung der klinischen Manifestation, Mitte: Inokulationsstelle, rechts: regionale Lymphadenopathie (http://emedicine.com/derm/topic69.htm, http://www.antibiotikamonitor.at/5_03/5_03_1.htm).

Außerdem können weitere Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Unwohlsein, Übelkeit, Gewichtsverlust und Splenomegalie hinzukommen (**Abb. 1**). In etwa 10 % der Fälle kommt es zu schwerwiegenderen Komplikationen wie z. B. dem Perinaud'schen okuloglandulären Syndrom, einer Enzephalitis, zerebralen Arteriitis, Radikulitis, Myelitis, granulomatösen Hepatitis und Splenitis (26,91,160). In der aus Lymphknotenmaterial angefertigten histologischen Untersuchung stellt sich die KKK

als nekrotisierende, granulomatöse Entzündungsreaktion mit lymphatischen Infiltraten und mehrkernigen Riesenzellen dar (8).

1.1.1.3.2 Vaskuloproliferative Krankheitsbilder

Eine herausragende Eigenschaft von *B. henselae* ist die Fähigkeit, vaskuloproliferative Erkrankungen beim Menschen hervorzurufen. Man spricht dabei von einer BA, sofern sie sich an der Haut oder den inneren Organen manifestiert, und von PH bei Befall der Leber. Beide treten im Gegensatz zur KKK in erster Linie bei Immunsupprimierten – v. a. *human immunodeficiency virus* (HIV)-positiven Patienten – auf. Die BA gilt demnach in der CDC-Klassifikation des U.S. Center for Disease Control and Prevention als AIDS-assoziierte Erkrankung und kann außer durch *B. henselae* auch durch *B. quintana* ausgelöst werden, während die PH ausschließlich durch *B. henselae* verursacht wird (43). Bei der BA lässt sich eine kutane Form (**Abb. 2**) mit einzeln oder multipel auftretenden kutanen Läsionen, die derb rötlich-livide imponieren, von einer parenchymatösen Form, bei der ausschließlich innere Organe wie Milz, Lymphknoten oder Knochenmark befallen sind, abgrenzen.

Abb. 2: Kutane Formen der BA bei AIDS-Patienten.
(links: http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/lectures/lecture/image/angiomat.jpg
mitte: http://edcenter.med.cornell.edu/Pathphysiology_Cases/HIV/Cutaneous_Manifestations
rechts: http://www.research.bidmc.harvard.edu/VPTutorials/HIV/Tphot06.htm)

Die bazilläre PH kann als Sonderform der BA angesehen werden, charakteristisch sind dilatierte Lebersinusoide und zystisch-gekammerte, blutgefüllte Endothelzell-Proliferationen (91,93,149).

Das Diagnostikum der Wahl ist bei KKK der indirekte Immunfluoreszenztest zum serologischen Nachweis von Antikörpern (127). Aus Gewebebiopsien bei BA und PH

kann außerdem der DNA-Nachweis (6) oder die kulturelle Anzucht versucht werden, wobei die Erregeranzucht in Zellkulturen am erfolgsversprechendsten ist (19).

Die KKK wird meist nur symptomatisch therapiert, treten Komplikationen auf, wird antibiotisch mit Azithromycin über 5 d behandelt. Eine BA und PH erfordern dagegen immer eine antibiotische Behandlung (in der Regel mit Makroliden, Tetracyclinen oder Rifampicin) über drei Wochen, was zumeist in der kompletten Rückbildung der vaskuloproliferativen Läsionen resultiert (2,8). Dies deutet darauf hin, dass es im Laufe der Infektion mit *B. henselae* wahrscheinlich nicht zur dauerhaften Transformation (z. B. über den Einbau bakterieller DNA ins Genom der Wirtszelle) kommt, wie es z. B. bei der Infektion von Pflanzenzellen mit *Agrobacterium tumefaciens* bekannt ist (33).

1.1.2 Pathogenitätsfaktoren der *Bartonella* spp.

Über die Pathogenitätsfaktoren der *Bartonella* spp. ist bis heute relativ wenig bekannt. Bei *Bartonella* spp. konnten zwei verschiedene Typ-IV-Sekretionssysteme (TIVSS) identifiziert werden: das VirB-D4 System ist homolog zu demjenigen von *A. tumefaciens* (141), während das Trw-TIVSS mit dem Trw-Konjugationssystem von *E. coli* eng verwandt ist. Das VirB-D4 System scheint für zahlreiche Phänomene im Verlauf einer Infektion von Endothelzellen verantwortlich zu sein, unter anderem für Apoptoseinhibition, Umorganisation des Zytoskeletts, Aktivierung einer proinflammatorischen Wirtszellantwort sowie der Hemmung der direkten Stimulation der Endothelzell-Proliferation (138). Als Substrate des VirB-D4 Systems wurden die translozierten Effektorproteine [*Bartonella-translocated effector proteins* (Bep)A-G, (145)] identifiziert. Das Trw-System kommt in *B. henselae* und *B. tribocorum* vor, wurde aber nur in *B. tribocorum* näher untersucht und scheint hier bei der Entstehung einer intraerythrozytären Bakteriämie eine Rolle zu spielen (43).

Weitere Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae* scheinen verschiedene Außenmembranproteine [*outer membrane proteins,* OMPs, (22)] zu sein, die eine proinflammatorische Wirtszellantwort in Endothelzellen (59) und eine Endothelzellproliferation (40) induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass das 43 kDa-Außenmembranprotein an Endothelzellen bindet, auch wenn der Endothelzellrezeptor bis heute nicht identifiziert werden konnte (22). Das

Außenmembranprotein Pap31 wurde als Hämin-Bindeprotein beschrieben, dem höchstwahrscheinlich eine Bedeutung als Pathogenitätsfaktor zukommt, da *B. henselae* Hämin zum Wachstum benötigt, es aber wohl nicht selbst synthetisieren kann (163).

Während sich aus einer Bakteriämie mit einer Vielzahl von humanpathogenen Erregern nicht selten ein septischer Schock entwickelt, ist damit bei einer durch *Bartonella* spp. verursachten Bakteriämie nicht zu rechnen. Das Lipopolysaccharid (LPS) der *Bartonella* spp. scheint demzufolge eine geringe endotoxische Aktivität aufzuweisen (107), die sich auf einige strukturelle Besonderheiten zurückführen lässt (161). Außerdem ist bekannt, dass *B. henselae*-LPS den *toll-like receptor* (TLR)-4 ungefähr 1000-fach schwächer induziert als beispielsweise *Salmonella enterica*-LPS (161).

B. baciliformis exprimiert unipolare Flagellen (136), die den Bakterien eine hohe Beweglichkeit ermöglichen, außerdem sind weitere Pathogenitätsfaktoren bekannt: Deformin (14), ein hydrophobes Molekül, das Protein Hämolysin (68) und der Invasion-assoziierte Locus (*ial*), der aus den beiden Genen *ialA* und *ialB* besteht (114).

1.1.2.1 *Bartonella* Adhäsin A

Trimere Autotransporter-Adhäsine (TAA) sind bedeutende Pathogenitätsfaktoren gramnegativer Bakterien, denen wahrscheinlich eine Bedeutung bei der Adhäsion an die Wirtszelle gemeinsam ist. TAAs bilden charakteristische trimere Oberflächenstrukturen mit einer Kopf-Stiel-Anker Architektur („*head-stalk-anchor*“) (99). Typischerweise sind diese nicht zu einer pilusartigen Struktur zusammengelagert (73).

Kürzlich konnte in *B. henselae* das hochmolekulare (~340 kDa) TAA *Bartonella* Adhäsin A (BadA) identifiziert werden (131). Bei BadA handelt es sich um die bisher als „Pili“ beschriebene Strukturen von *B. henselae.*

Yersinia Adhäsin A (YadA) von *Yersinia enterocolitica* ist das bestcharakterisierte Adhäsin dieser neuen Gruppe trimerer Autotransporter-Adhäsine, zu denen auch

BadA gehört, die bei einer Reihe von Proteobakterien vorkommen. Ihnen kommt eine bedeutende Funktion bei der Anpassung an eine bestimmte ökologische Nische zu. YadA, der Prototyp der TAA, ist modular aufgebaut: es besteht aus einer N-terminalen globulären Kopfdomäne („*head*“), einem Stiel („*stalk*“), der durch eine „*coiled coil*“-Struktur gebildet wird, und einer C-terminalen Membran-Anker Domäne („*membrane anchor*“). Zwischen der Kopf- und der Stiel-Domäne liegt eine kurze Sequenz, die als „*neck*“ bezeichnet wird und ein neues Trimerisierungsmotiv darstellt. Bei dieser „*neck*“-Struktur und der Membran-Anker Domäne handelt es sich um in der Klasse der TAA höchst konservierte Motive (133). YadA erfüllt alle Kriterien eines Autotransporters, also eines Außenmembranproteins, das alle nötigen Informationen für seinen Transport zur äußeren Membran und zur Translokation durch diese selbst erhält (67).

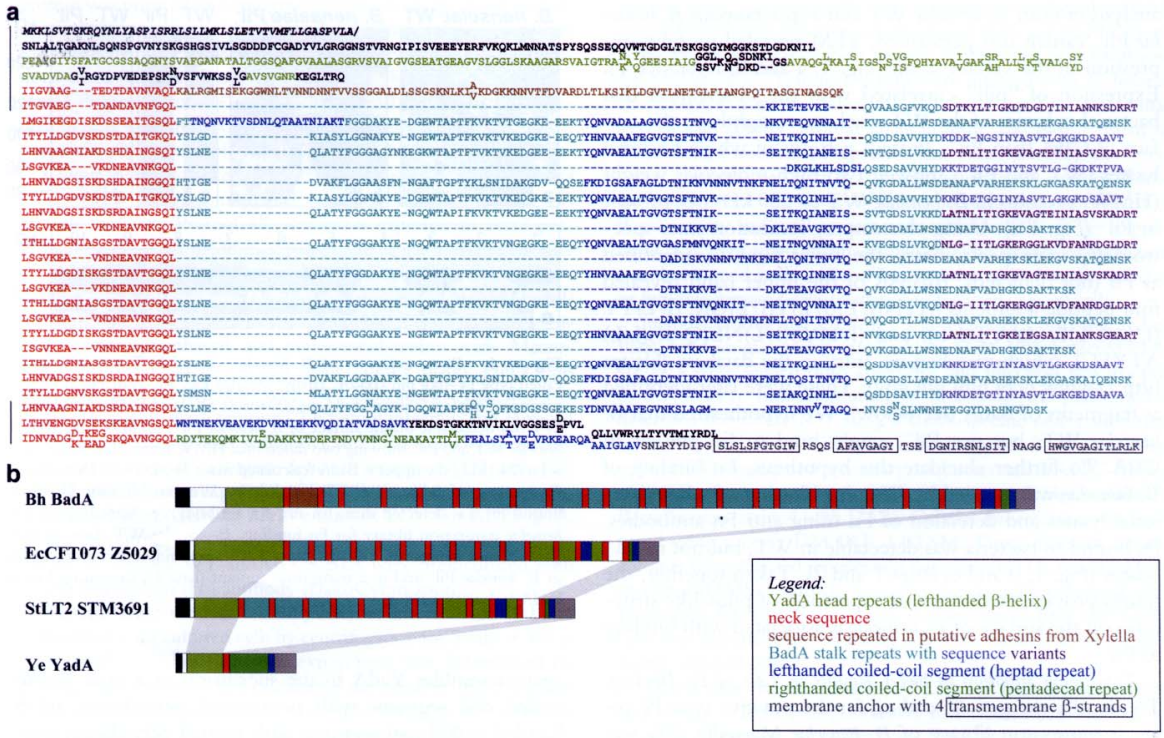


Abb. 3: Proteindomänenstruktur von BadA. (**a**) Aminosäuresequenz und (**b**) schematische Zeichnung der BadA-Domänenstruktur. Einzelne Domänen sind in den jeweiligen Farben dargestellt (Farbschema in der Legende rechts unten angegeben). Diejenigen Regionen, die nicht über Sequenzhomologien zu anderen TAAs in Bezug gesetzt werden konnten, sind in schwarzer Schrift (**a**) oder als nichtkolorierte Abschnitte (**b**) dargestellt. Die hier gezeigte Sequenz ist BadA von *B. henselae* Houston-1; die Regionen, die sich auch aus der Sequenz von *B. henselae* Marseille ableiten, sind durch schwarze Striche (**Abb. 3a**) dargestellt. Sequenzunterschiede zwischen den beiden Stämmen sind übereinander angeordnet (Houston-1-Sequenz: oben, Marseille-Sequenz: unten). In **Abb. 3b** sind die strukturellen Äquivalente verschiedener TAAs über graue Balken miteinander verbunden (Bh, *Bartonella henselae*; EcCFT073, *Escherichia coli* strain CFT073; StLT2, *Salmonella typhimurium* strain LT2; Ye, *Yersinia enterocolitica*). Entnommen aus (131).

BadA ist wie YadA modular aufgebaut (**Abb. 3**). N-terminal weist BadA eine putative Signalsequenz auf, gefolgt von einer Region, wie sie nur BadA aufweist, und einer Domäne mit elf Sequenzwiederholungen, die der YadA Kopf-Domäne ähnelt. C-terminal findet sich eine ebenfalls zu YadA homologe Membran-Anker Domäne, die vier Transmembran-β-Faltblattstrukturen enthält. Der zentrale Bereich von BadA ist hochrepetitiv und enthält 21 Motive, die *„coiled coil"*-Segmente enthalten und durch *„neck"*-Sequenzen voneinander getrennt werden (131). BadA ist nicht nur für die Adhärenz an Komponenten der extrazelluläre Matrix und an Endothelzellen bedeutsam, sondern auch essentiell für die Aktivierung einer proangiogenetischen Wirtszellantwort (131). Es konnte gezeigt werden dass die Aktivierung von *hypoxia inducible factor* (HIF)-1 und die Sekretion der proangiogenetischen Zytokine *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Adrenomedullin (ADM) und *insuline like growth factor binding protein*-3 (IGFBP-3) in *B. henselae*–infizierten Epithelzellen eng mit der Expression von BadA korreliert (131). Außerdem scheint BadA während einer *B. henselae*-Infektion exprimiert zu werden und eine immunodominante Wirkung zu haben (131), wie sie auch von *Neisseria* Adhäsin A (NadA), das ebenfalls zur Klasse der TAAs gehört, bei der Infektion von Mäusen beschrieben worden ist (39).

Proteine, die Homologien zu BadA aufweisen, wurden in *B. quintana* als *variably expressed outer membrane proteins* [VOMPs, (162)] und in *B. vinsonii* als *Bartonella repeat proteins* [BrpA-C, (63)] identifiziert.

1.2 Angiogenese

Unter dem Begriff Angiogenese versteht man die Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen (132). Bislang konnten vier verschiedene Mechanismen beschrieben werden: am besten untersucht wurden die Mechanismen der (i) Sprossung von Gefäßen („*sprouting angiogenesis*“) und (ii) Längsteilung durch Einstülpung von sich gegenüberliegenden Endothelflächen („*intussuception*“). Zudem kann es zur (iii) Gefäßneubildung durch Formation von transendothelialen Zellbrücken mit anschließender Auftrennung in einzelne Kapillaren [„*bridging angiogenesis*“, (29)] oder durch (iv) Fusion mehrerer kleiner Gefäße zu einem größeren kommen (132).

Vom Begriff der Angiogenese ist die Vaskulogenese abzugrenzen, die die Bildung eines primären Gefäßnetzes durch Differenzierung mesenchymaler Angioblasten während der Embryonalentwicklung beschreibt (28). Als natürlicher Prozess spielt die Angiogenese während der Embryonalentwicklung eine zentrale Rolle: das kardiovaskuläre System ist das erste funktionierende Organsystem (132).

Beim Erwachsenen ist Angiogenese physiologischerweise nur im Verlauf des weiblichen Menstruationszyklus, während der Schwangerschaft und bei Wundheilungsprozessen zu beobachten. Ansonsten tritt Angiogenese im Zusammenhang mit einer Vielzahl von pathologischen Vorgängen wie bei neoplastischen (58) und entzündlichen (Psoriasis, Arthritis, Arteriosklerose) Erkrankungen sowie viralen Infektionskrankheiten auf (27,29). Der Fokus der medizinischen Forschung ist jedoch stark auf die Rolle der Angiogenese bei der Entstehung solider Tumore gerichtet, deren Wachstum ohne Blutgefäße limitiert ist (29). Es ist beschrieben worden, dass ein Tumor, von wenigen Ausnahmen abgesehen, Angiogenese induzieren muss, um über eine Größe von 1-2 mm im Durchmesser wachsen zu können. Im Gegensatz dazu könnte eine Stimulation der Angiogenese in Zukunft bei ischämischen Erkrankungen wie beispielsweise der koronaren Herzerkrankung als Therapieoption in Frage kommen (96).

1.2.1 Mechanismen und Regulation der Angiogenese

Endothelzellen kommt eine zentrale Bedeutung bei der Angiogenese zu, sie kleiden die Gefäße aus und durchlaufen während der Angiogenese kaskadenartig die Phasen der Migration, Proliferation und Differenzierung (27,57).

Die bedeutendste Gruppe von Angiogenese-Stimulatoren in physiologischer und pathologischer Angiogenese stellt die Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factors,* VEGFs) dar, die ihre Wirkung über Rezeptor-Tyrosinkinasen (VEGF-Rezeptor-1, -2) vermitteln. Zu dieser VEGF-Familie gehören außer VEGF-A, -B, -C, -D, -E auch die plazentaren Wachstumsfaktor 1 und 2 (*placenta growth factor,* PLGF-1, -2). Die Schlüsselstellung von VEGF-A bei der Induktion von Gefäßwachstum ist dabei unbestritten (97), während VEGF-C und VEGF-D das Lymphgefäßwachstum regulieren (81). Die Blockade der VEGF-Signalübertragung stellt möglicherweise eine bedeutende tumortherapeutische Strategie dar; mit dem VEGF-spezifischen Antikörper Bevacizumab (Avastin®) hat das erste antiangiogene Therapeutikum die Phase III der klinischen Prüfung abgeschlossen (81,159). Weitere wichtige Stimulatoren der angiogenetischen Kaskade sind der *fibroblast growth factor* (FGF) sowie der *epidermal growth factor* [EGF, (132)]. Zu den wichtigsten Angiogenese-Inhibitoren, die u. a. von Monozyten, Makrophagen, Blutplättchen, Mastzellen, Tumorzellen und hämatopoetischen Zellen gebildet werden, gehören Endostatin, Angiostatin, Vasostatin, Tumstatin, Thrombospondin und γ-Interferon (29).

Die angiogenetische Kaskade kommt in Gang, wenn das Gleichgewicht von Angiogenese-Stimulatoren und –Inhibitoren zugunsten der Stimulatoren verschoben ist [*angiogenic switch*, (65)]. Der initiale Auslöser hierfür kann vielfältig sein und bewirkt die Abgabe proangiogener Stimuli (29), unter denen VEGF eine zentrale Bedeutung zukommt (132). Daraufhin kommt es zur Proliferation von Endothelzellen, die in die umgebende extrazelluläre Matrix einwandern. Die Richtung des sich bildenden Kapillarsprosses ist nicht willkürlich, sondern wird durch kontaktabhängige Rezeptor-Liganden-Systeme kontrolliert. Nach Ausbildung des Gefäßlumens bewirken die Zytokine VEGF und Angiopoetin ebenso wie die Blutzirkulation und die Wechselwirkung zwischen muralen Zellen und Endothelzellen eine Stabilisierung des noch unreifen Endothels (132). Kontakte zwischen muralen und endothelialen Zellen

führen außerdem über den *transforming growth factor*β-1 (TGFβ-1) zu einer Hemmung der weiteren Proliferation (132). Am Ende der angiogenetischen Kaskade steht ein ausgereiftes Gefäß mit ruhendem und stabilisiertem Endothel.

Im Gegensatz zur physiologischen Angiogenese läuft die Tumorangiogenese nicht so streng kontrolliert ab. Als Folge können die Tumorgefäße strukturell und funktionell abnormal und durch das Fehlen von muralen Zellen oder Basalmembranen imponieren. Durch das Fehlen der Basalmembran kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand, die die Metastasierung der Tumorzellen erleichtert (132).

1.2.1.1 Der Transkriptionsfaktor *Hypoxia inducible factor* (HIF)-1

Die Aktivierung Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktoren (*hypoxia inducible factors,* HIFs) trägt entscheidend zur Angiogenese bei, da diese Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener angiogenetischer Faktoren regulieren (148). Bei HIF-1 handelt es sich um einen sauerstoffregulierten Transkriptionsfaktor, der bei einer Vielzahl von Erkrankungen aktiviert wird, die mit Gewebehypoxie (z. B. ischämische oder neoplastische Erkrankungen) einhergehen (112,158), und der wiederum die angiogenetisch wirksamen Zytokine VEGF (51,55), ADM (30,88) und IGFBP-3 (129,137) induziert. Außer durch Hypoxie wird HIF-1 auch durch Eisenmangel aktiviert (38).

HIF-1 ist ein αβ-Heterodimer, dessen Untereinheiten zur Familie der *basic helix-loop-helix* Transkriptionsfaktoren gehören (156). Beide Untereinheiten werden konstitutiv exprimiert. Während jedoch die HIF-1β Untereinheit, die auch unter dem Namen *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) bekannt ist, unter Normoxie in konstanter Konzentration in der Zelle vorliegt, wird HIF-1α nach Ubiquitinierung des Proteasoms mit einer Halbwertszeit von weniger als 5 min abgebaut (78,153). Die Aktivität von HIF-1 kann außerdem durch Inaktivierung der C-terminalen Transaktivierungsdomäne von HIF-1α durch Hydroxylierung mittels einer Asparaginylhydroxylase (105) reguliert werden.

Aufgrund seiner Kernlokalisierungssequenz wird die HIF-1α-Untereinheit aus dem Zytoplasma in den Zellkern transportiert (77). Im Zellkern wird dann das aktive

Heterodimer HIF-1 gebildet und durch dessen Bindung an seine spezifische Erkennungssequenz (*hypoxia responsive elements;* HREs) im Promotorbereich der Zielgene die Transkription dieser Gene angeschaltet (148).

1.2.1.2 Der Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor-κB (NF-κB)

NF-κB stellt einen weiteren für die Angiogenese bedeutenden Transkriptionsfaktor dar. Vielfältige Stimuli bewirken die Aktivierung von NF-κB wie z. B. Zytokine [Tumornekrosefaktor (TNF)-α, Interleukin (IL)-1)], bakterielle Lipopolysaccharide, ultraviolette Strahlung und Wasserstoffperoxid (98). NF-κB-regulierte Gene sind an einer Vielzahl von Vorgängen wie Angiogenese, Apoptoseinhibition, Inflammation, Onkogenese und Proliferation beteiligt (3). Von besonderem Interesse für die onkologische Forschung ist die antiapoptotische Wirkung von NF-κB sowie die Induktion des sowohl proinflammatorischen als auch proangiogenetischen Zytokins IL-8 (89).

NF-κB ist als Dimer aus den Untereinheiten p50, p52, p65, RelB und c-Rel aufgebaut (62). Am häufigsten kommt ein Heterodimer vor, das aus den p65/p50-Untereinheiten besteht. Durch Bindung an seinen spezifischen Inhibitor κB (IκB) wird NF-κB inaktiviert und im Zytoplasma zurückgehalten (3). Nach einer Phosphorylierung von IκB und dessen anschließender Ubiquitinierung und Degradation durch das Proteasom wird NF-κB freigesetzt und in den Zellkern transloziert. Dort bindet der Transkriptionsfaktor an die Promotoren zahlreicher Zielgene und initiiert deren Transkription (61,80,120). Die Feinregulation der transkriptionellen Aktivität von NF-κB kann zudem durch Phosphorylierung seiner Untereinheiten sowie durch Bindung von Ko-Aktivatoren erfolgen (143,144).

1.3 Bakteriell induzierte Angiogenese

Bei einigen Infektionserkrankungen können pathologische angiogenetische Vorgänge beobachtet werden. Dies wurde für die viralen Erreger Humanes Herpesvirus-8 (HHV-8) und das Orf-Virus beschrieben. HHV-8 verursacht bei AIDS-Patienten die Entstehung des sogenannten Kaposi-Sarkoms, einer opportunistischen Erkrankung, die sich durch starke Endothelzell-Proliferation auszeichnet (135). Dabei kodiert HHV-8 für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der über eine Aktivierung von HIF-1α die VEGF-Expression induziert (150). Das Orf-Virus ist ein weltweit verbreitetes, epitheliotropes Parapox-Virus, das bei Schafen, Ziegen und Menschen Hautläsionen verursacht. Diese imponieren histopathologisch durch die massive Proliferation und Dilatation von Kapillaren. Dieses Virus kodiert für VEGF-E, ein neues Mitglied der VEGF-Familie, das *in vivo* angioproliferativ wirkt (113).

Von bakterieller Seite ist bislang einzig für *B. bacilliformis, B. quintana* und *B. henselae*, den Erregern der vaskuloproliferativen Erkrankungen Verruga peruana (**1.1.1.1**), BA und PH (**1.1.1.3.2**), eine Induktion der Angiogenese beschrieben worden (60,92,109). *B. henselae* konnte dabei in engem Kontakt zum proliferierenden Endothel nachgewiesen werden (8). Endothelzellen stellen wohl die Zielzellen einer *Bartonella*-Infektion in allen Reservoirwirten, den Menschen eingeschlossen, dar (43). Demzufolge wird der Interaktion von *B. henselae* mit Endothelzellen eine große Bedeutung beigemessen. Es konnte gezeigt werden, dass *B. bacilliformis, B. quintana* und *B. henselae* im Verlauf einer Infektion ins Endothel eindringen (20,46,155) und zumindest *B. henselae* und *B. quintana* in HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) replizieren. Dies konnte direkt durch Mikroskopie und durch Quantifizierung der intrazellulären Bakterien und indirekt durch Zunahme der ribosomalen RNA nachgewiesen werden (20,85).

Die Invasion von *Bartonella* spp. in Endothelzellen erfolgt sowohl über den klassischen Invasionsprozess einer Bakterien-vermittelten Endozytose (49) als auch über einen Aufnahmemechanismus, der über die Internalisation sogenannter „Invasomen“ verläuft. Bei letzterem werden die Bakterien aktiv an einem Pol der Zelle akkumuliert, bevor das gebildete Aggregat durch Umordnung des Aktin-Zytoskeletts

eingehüllt und schließlich vollständig internalisiert wird (46). Nach der Invasion in Endothelzellen repliziert *B. henselae* schneller als auf unbelebten Standardnährböden (85).

In vitro-Untersuchungen ergaben, dass sich mindestens drei verschiedene Mechanismen in der Induktion der vaskuloproliferativen Erkrankungen BA und PH durch *B. henselae* zu überlagern scheinen: (i) direkte Stimulation der Endothelzellproliferation, (ii) Hemmung der Endothelzellapoptose und (iii) Auslösung der Sekretion vaskuloproliferativer Zytokine. Bereits 1994 wurde nachgewiesen, dass lebende *B. henselae* direkt oder über sekretierte Produkte die Proliferation von Endothelzellen stimulieren (40,103), bislang ist es jedoch nicht gelungen, dieses Phänomen näher zu charakterisieren. Die Verhinderung der Apoptose von Endothelzellen scheint einen weiteren Mechanismus in der Entstehung *Bartonella*-induzierter Vaskuloproliferationen darzustellen. Es wurde nachgewiesen, dass *B. henselae* die Apoptose von Endothelzellen über eine Hemmung der Caspase-3-Aktivierung inhibiert. Dabei ist ein direkter Kontakt zwischen dem Bakterium und der Wirtszelle nicht notwendig, da konditionierte Zellkulturüberstände ebenfalls in der Lage sind, die Apoptose zu verhindern (87). Für diese Inhibition der Endothelzellapoptose scheint das virB TIVSS von *B. henselae* essentiell zu sein (138). Außerdem konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine *B. henselae*-Infektion zur Sekretion parakrin wirkender proangiogenetischer Zytokine (z. B. VEGF, IL-8) führt (86,128), die ihrerseits eine starke Endothelzellproliferation auslösen. Noch nicht geklärt ist, inwieweit eine proinflammatorische Endothelzellantwort, die über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und die dadurch bedingte Zunahme der Expression von *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 und E-Selektin charakterisiert ist (59), zur Angiogenese beiträgt.

Die Aktivierung der Endothelzellproliferation durch *B. henselae, B. quintana und B. bacilliformis* (40,60,103,121) kann als neuartige Pathogenitätsstrategie humanpathogener Bakterien verstanden werden, durch die sich der Erreger (*Bartonella* spp.) sein eigenes Habitat sichert. Demnach wäre eine Tumorinduktion durch *Bartonella* spp. darauf ausgerichtet, dem Bakterium selbst Wachstumsvorteile zu sichern. Eine ähnliche Strategie ist für das Pflanzenpathogen *Agrobacterium tumefaciens* bekannt, dem Auslöser der Wurzelhalsgalle (33). Die Transfer-DNA von

A. tumefaciens, die für wachstumsanregende Faktoren der Pflanze (Auxine, Zytokinine) kodiert, wird nach einer TIVSS-abhängigen Translokation stabil ins Pflanzengenom inseriert. Durch die Bildung eines vaskulären Pflanzentumors wird *A. tumefaciens* mit Nährstoffen (Opinen) versorgt und schafft sich so ein geeignetes Habitat. *B. henselae* ist phylogenetisch eng mit *A. tumefaciens* verwandt und verfügt ebenfalls über ein homologes TIVSS (7,119,141). Analog zum *A. tumefaciens*-Modell entstand daraus das „paracrine-loop"-Modell, das die Induktion der Endothelproliferation durch *B. henselae* über VEGF beschreibt (82). Danach führt die Infektion der Wirtszelle zur Bildung von Wachstumsfaktoren, die anschließend die Zielzellproliferation anregen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Fähigkeit von *B. henselae,* vaskuloproliferative Krankheitsbilder auszulösen, ist einzigartig unter allen humanpathogenen Bakterien. Dabei stellen Endothelzellen die Zielzellen einer Infektion mit *B. henselae* dar (45). In dieser Arbeit sollte die Wirtszellantwort in Endothelzellen nach Infektion mit *B. henselae* detailliert untersucht werden und die angiogenetische, HIF-1 regulierte von der entzündlichen, NF-κB regulierten Endothelzellantwort abgegrenzt werden.

Dabei sollte insbesondere der Einfluss des trimeren Autotransporter-Adhäsins BadA, das bekannterweise bedeutend für die Adhärenz an Endothelzellen und für die Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort ist (131), auf die Endothelzellantwort näher charakterisiert werden.

Im Einzelnen sollten Endothelzellen (HUVECs) mit *B. henselae* WT und BadA$^-$, einer BadA-defizienten Transposonmutante (131), infiziert werden und die Adhärenz und Invasion mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) untersucht werden. Des weiteren sollte die Aktivierung von HIF-1 und NF-κB bzw. der HIF-1-regulierten Gene VEGF und Hexokinase (HK) 2 und der NF-κB-regulierten Gene IL-8, MCP-1 und ICAM-1 mittels Western Blots, RT- und Light-Cycler PCRs sowie die Sekretion der Zytokine VEGF und IL-8 mittels ELISA im Zeitverlauf analysiert werden.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob BadA selbst das Potential zur Induktion einer angiogenetischen Zellantwort besitzt oder ausschließlich die Funktion eines Adhäsins erfüllt. Da es bislang nicht gelungen ist, BadA in voller Länge zu exprimieren, sollte in dieser Arbeit die Funktion einzelner BadA-Domänen näher untersucht werden. Dafür sollten Endothel- und Epithelzellen (HUVECs und HeLa) mit aufgereinigtem $BadA_{Kopf}$- und $BadA_{Stiel}$-Protein stimuliert und die Aktivierung von HIF-1, sowie die Induktion des HIF-1-regulierten VEGF und des NF-κB-regulierten IL-8 bestimmt werden. Zusätzlich sollte die Adhärenz der BadA-Domänen an diese Zellen untersucht werden.

Außerdem sollten Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae*, die für die Induktion einer proinflammatorischen Wirtszellantwort verantwortlich sind, näher analysiert werden.

Die Struktur von *B. henselae*-LPS wurde beschrieben (161), seine Bedeutung in der Pathogenese ist jedoch überwiegend unklar. Die Rolle von *B. henselae* OMPs im Infektionsverlauf ist weitgehend unbekannt. Näher analysiert wurde lediglich das 43 kDa OMP, das bedeutend für die Adhärenz an Endothelzellen ist (22), sowie die 23-92 kDa großen Außenmembranproteine, denen eine Bedeutung bei der Induktion einer NF-κB abhängigen proinflammatorische Wirtszellantwort zukommt (59). In dieser Arbeit sollte die LPS bzw. OMPs-induzierte Zytokinsekretion (VEGF, IL-8) in Endothel- und Epithelzellen mittels ELISA untersucht werden. Überdies sollte analysiert werden, ob die *B. henselae*-induzierte NF-κB Aktivierung LPS-vermittelt stattfindet.

Die Standardmethode zum Nachweis von *Bartonella*-Infektionen ist der serologische Nachweis von Antikörpern im indirekten Immunfluoreszenztest [IFT, (1)], der jedoch relativ aufwändig und im Ergebnis vom Untersucher abhängig ist. Es ist bekannt, dass BadA ebenso wie NadA (39) im Infektionsverlauf eine immunodominante Wirkung zukommt (131). Deshalb sollte in dieser Arbeit die Verwendbarkeit von BadA im Immunoblot als serodiagnostischer Marker analysiert werden. Dafür sollten im IFT auf Antikörper gegen *Bartonella* getestete Patientenseren im Immunoblot untersucht und die Nachweisbarkeit von anti-BadA-Antikörpern analysiert werden. Außerdem sollte die Sensitivität und Spezifität dieser diagnostischen Methode im Vergleich zum IFT als Standardmethode bestimmt werden. Zusätzlich sollten andere Proteinbanden im Immunoblot auf ihre Tauglichkeit als diagnostische Marker untersucht werden. Dafür wurden Ganzzelllysate verschiedener Bakterienstämme, OMPs und BadA-Domänen im Western Blot mit Patientenseren untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

Agarose Gelelektrophoresekammern	BioRad, München
Analysenwaage BP610, PT1200	Sartorius, Göttingen
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
ELISA Washer	Tecan
Eppendorfpipetten und Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Filmentwickler: Curix 60	AGFA, Köln
Fluoreszenzmikrosop Axiovert 200	Zeiss, Jena
Geldokumentation: Fluor-S Multi-Imager	BioRad
Konfokales Lasermikroskop DM IRE 2	Leica, Bensheim
Light Cycler System	Roche, Grenzach-Wyhlen
Mikroskope (Zellkultur)	Zeiss
Mikrowellenherd: Mikromat	AEG, Frankfurt/Main
PCR-Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
pH-Meter: Modell inoLab Level 2	WTW, Weilheim
Photometer: Ultrospec 3000 pro	Eppendorf
Plattenschüttler	Multimed Wicker, Kirchheim/Teck
Rollenmischer	Greiner, Nürtingen
Software: Photoshop 7.0	Adobe Systems, Mountain View, CA, USA
Spannungsquellen für Gelelektrophorese	BioRad
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschall Branson-Sonifier 250	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Ultra Turrax T8	Ika-Werke, Staufen
Reagenzglasschüttler	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach

Zentrifugen:

Eppendorf 5417R	Eppendorf
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Biofuge Stratus	Heraeus
Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Optima™ Max	Beckman Coulter
MiniSpin plus	Eppendorf

2.1.2 Materialien

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

Autoradiographie-Filme (Kodak X-OMAT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Einmalküvetten	Sarstedt, Berlin
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Immobilon-P-Transfermembran (PVDF)	Millipore, Schwalbach
Light-Cycler Kapillaren	Roche
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Menasha, Wyoming, USA
Pasteurpipetten	Hilgenberg, Malsfeld
PCR-Gefäße	Fisher Scientific, Schwerte
Whatman Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Neubauer Zählkammer	Superior, Lauda-Koenigshofen

2.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders aufgeführt wurden alle Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
APS	Applichem, Darmstadt
Bradford-Reagenz	BioRad
BSA	Biomol, Hamburg

DAB	Applichem
DEPC-H_2O	Ambion, Huntingdon, UK
DMSO	Roth
dNTPs	Roche
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
ECL	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
FCS	Sigma-Aldrich
Fluoroprep	BioMérieux, Marcy l'Etoile, F
Glycin	Roth
Hepes	Ambion, Huntingdon, UK
Kollagen G	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Gibco BRL
Magermilchpulver	Sucofin, Düsseldorf
$MgCl_2$	Boehringer, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PBS (+$CaCl_2$/$MgCl_2$)	Gibco, Karlsruhe
PBS Dulbecco (ohne $CaCl_2$/$MgCl_2$)	Biochrom
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich
PMA	Sigma-Aldrich
PMSF	Sigma-Aldrich
PNPP	Sigma-Aldrich
Ponceau S Lösung	Serva, Heidelberg
SDS ultra pure	Roth
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich
Triton-X	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Gibco BRL
Urea	Roth

2.1.4 Kits

LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche
LightCycler Primer Set für G-6-PDH	Search-LC, Heidelberg
LightCycler Primer Set für IL-8	Search-LC
Quantikine Immunoassay VEGF	R&D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen

2.1.5 Antibiotika

Ampicillin	ICN Biomedicals, Irvine, California, USA
Gentamicin	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Kanamycin	Sigma
Kanamycin Plättchen (30 µg)	Oxoid

2.1.6 Größenstandards

Biotinylierte Protein Leiter	Cell Signaling
Bench Mark Ladder (Protein Leiter)	Invitrogen
Page Ruler Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
1 kb Plus DNA -Leiter	Invitrogen

2.1.7 Enzyme

Biotin-alkalische Phosphatase	Dako, Neuss
Reverse Transkriptase: Super Script II (200 U/µl)	Invitrogen
Taq-Polymerase	Roche
Proteinase K	Qiagen, Hilden

2.1.8 Zytokine

Rekombinantes humanes IL-8	Pharmingen, San Diego, California, USA

Rekombinantes humanes VEGF	R&D Systems, Wiesbaden
TNF-α	Sigma-Aldric

2.1.9 Antikörper

Tab. 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Bezeichnung	**Verwendung**	**Herkunft**
anti-*Bartonella* (Kaninchen)	DIF	(85)
anti-*Bartonella* (Maus)	DIF	(85)
anti-BadA (Kaninchen)	DIF	(131)
anti-$BadA_{Kopf}$ (Maus)	Western Blot	diese Arbeit
anti-Kaninchen-IgG-FITC (Ziege)	DIF	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen-IgG-TRITC (Ziege)	DIF	Sigma-Aldrich
anti-Kaninchen-IgG2(Fab')-Cy5 (Ziege)	DIF	Dianova
anti-human-IL-8 (Capture Antibody)	ELISA	Becton-Dickinson
anti-human-IL-8-biotinyliert (Detection Antibody)	ELISA	Becton-Dickinson
anti-Biotin-HRP	Western Blot	Cell Signaling, Frankfurt/Main
anti-HIF-1α (Maus)	Western Blot	Becton-Dickinson
anti-Phospho-p38 MAPK	Western Blot	Cell Signaling
anti-p38 MAPK	Western Blot	Cell Signaling
anti-Maus-Ig-HRP (Kaninchen)	Western Blot	Dako
anti-Kaninchen-Ig-HRP (Schwein)	Western Blot	Cell Signaling
anti-human-Ig-HRP (Kaninchen)	Western Blot	Dako
anti-β-Aktin	Western Blot	Sigma-Aldrich

2.1.10 Oligonukleotide

Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')	Verwendung	Herkunft	Referenz
HK 2 (*forward*)	TCA ACC CCG GCA AGC AGA GG	PCR	Metabion	(123)
HK 2 (*reverse*)	CCG CCG GGC CAC CAC AGT	PCR	Metabion	(123)
ICAM-1 (*forward*)	AAA GGA TGG CAC TTT CCC AC	PCR	Metabion	(83)
ICAM-1 (*reverse*)	TTC CCC TCT CAT CAG GCT AGA C	PCR	Metabion	(83)
MCP-1 (*forward*)	TCT GTG CCT GCT GCT CAT AGC	PCR	Metabion	(79)
MCP-1 (*reverse*)	GGG TAG AAC TGT GGT TCA AGA GG	PCR	Metabion	(79)
β-Aktin (*reverse*)	TAG AAG CAT TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG	PCR	Qiagen	(83)
β-Aktin (*forward*)	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA	PCR	Qiagen	(83)
VEGFex3 for	CCC TGA TGA GAT CGA GTA CAT CTT	LightCycler	TIB Molbiol, Berlin	(157)
VEGFex8r	ACC GCC TCG GCT TGT CAC	LightCycler	TIB Molbiol	(157)
TM VEGFex3	ATC CTG TGT GCC CCT GAT GCG ATG CGG T	LightCycler	TIB Molbiol	(157)
B2M F	GAT GAG TAT GCC TGC CGT GTG	LightCycler	TIB Molbiol	(157)
B2M R	CAA TCC AAA TGC GGC ATC T	LightCycler	TIB Molbiol	(157)
B2M TaqMan	CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT GTC TCG ATC CC	LightCycler	TIB Molbiol	(157)

2.1.11 Bakterienstämme und Bakterienkulturmedien

Tab. 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Bezeichnung	**Referenz**
Bartonella henselae Marseille	(50)
Bartonella henselae Houston-1	(126)
Bartonella henselae BadA$^-$	(131)
Bartonella quintana Toulouse	(4)
Bartonella quintana München	(140)

Tab. 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienkulturmedien

Columbia-Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l H_2O, pH 7,5
Einfriermedium für Bakterien	20 % Glycerol in LB-Medium

2.1.12 Zellkulturmedien

Die Medien für Zellkultur wurden steril angesetzt und bei 4 °C gelagert. Das fötale Kälberserum (FCS) wurde vor Benutzung 30 min bei 56 °C im Wasserbad Komplement-inaktiviert. Für Infektionsexperimente wurden Medien ohne Antibiotika verwendet.

Tab. 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien

Zell-Linie	Kulturmedium	Infektionsmedium
HeLa 229	RPMI 1640 (Biochrom) 10 % FCS 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	RPMI 1640 (Biochrom) 2 mM Glutamin
HUVEC	*Endothelial Cell Growth Medium* (PromoCell, Mannheim) Supplement Mix 10 % FCS	*Endothelial Cell Basal Medium* (PromoCell)

2.1.13 Puffer und Lösungen

Tab. 6: Puffer zur Herstellung von Proteinextrakten

Zelllyse-Puffer (EB-Puffer)	7 M Urea 1 % SDS 10 % Glycerol 10 mM Tris/HCl pH 6,8 1 Tablette Complete Protease Inhibitor^{TM} Cocktail (Roche) 0,5 mM PMSF 5 mM DTT ad 50 ml H_2O

Tab. 7: Pfuffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

SDS-Probenpuffer (5x) (Laemmli Puffer)	312,5 mM Tris/HCl (pH 6,8) 50 % Glycerin 10 % (w/v) SDS 250 mM DTT 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	50 mM Tris 384 mM Glycin 0,1 % SDS ad 1000 ml H_2O
Lösung für Sammelgel (2 Gele)	500 µl 30 % Acrylamid-Stammlösung 380 µl 1 M Tris pH 6,8 30 µl 10 % SDS 30 µl 10 % APS 3 µl TEMED 2,1 ml H_2O
Lösung für 8 %-iges Trenngel (2 Gele)	2,7 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung 2,5 ml 1 M Tris pH 8,8 100 µl 10 % SDS 100 µl 10 % APS 6 µl TEMED 4,6 ml H_2O
Blot-Puffer (10x)	25 mM Tris 192 mM Glycin ad 1000 ml H_2O
Waschpuffer (10x)	10 mM Tris/HCl pH 7,4 0,15 mM NaCl 0,2 % Tween 20 ad 2000 ml H_2O
Blockpuffer	3 % bzw. 5 % Magermilchpulver in Waschpuffer

Tab. 8: Übersicht über die Lösungen zum Entwickeln eines Western-Blots

Enhanced Chemiluminescence (ECL) Detektion	
Luminol	0,22 g Luminol ad. 5 ml DMSO
Cumarinsäure	0,075 g ad. 5 ml DMSO
Lösung 1	250 µl Luminol 220 µl Cumarinsäure ad. 25 ml Tris/HCl (100 mM, pH 8,5)
Lösung 2	15 µl H_2O_2 (30%) ad. 25 ml Tris/HCl (100 mM, pH 8,5)

Lösung zur Detektion mit DAB	
Substratpuffer	3,03 g Tris 122 mg Imidazol (3,5 mM) ad 500 ml H_2O, pH 7,4
DAB-Färbelösung	12 ml Substratpuffer 12,5 mg DAB 6 µl H_2O_2
Stopplösung	486,3 ml H_2O 13,7 ml H_2SO_4 (95-98 %)

Tab. 9: Übersicht über Puffer und Lösungen für IL-8 ELISA

Waschpuffer	PBS + 0,05 % Tween 20
Blockierungspuffer	PBS + 10 % FCS
Bindungspuffer	0,1 M Na_2HPO_4 (pH 9)
Substratpuffer	0,05 M $NaHCO_3$ (pH 8,09) 0,05 M Na_2CO_3 (pH 11,3) 0,5 mM $MgCl_2$
Konjugat	4,5 µl Streptavidin 4,5 µl Biotin-alkalische Phosphatase 491 µl PBS 30 min inkubieren ad 25 ml PBS
Entwicklerlösung	1 mg PNPP/ml Substratpuffer

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterien

Für die Infektionsexperimente dieser Arbeit wurden vorwiegend die Bakterienstämme *Bartonella henselae* Marseille WT und *Bartonella henselae* BadA$^-$ eingesetzt. Für die diagnostischen Untersuchungen von Patientenseren mittels Western Blot und Immunfluoreszenz-Test (IFT) wurden außerdem die Stämme *Bartonella henselae* Houston-1, *Bartonella quintana* Toulouse und *Bartonella quintana* München verwendet.

2.2.1.1 Bakterienanzucht und Kultivierung für *in vitro* Experimente

Die Bakterien wurden auf Columbia-Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut kultiviert und bei 37°C, 5 % CO_2 und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit 3-5 d inkubiert. Für die Kultivierung von *B. henselae* BadA$^-$ (kan^R) wurden auf die Blutplatten je zwei Kanamycin-Plättchen aufgelegt.

Für Infektionsexperimente wurden Bakterien aus vorgefertigten Bakterienstocks (**2.2.1.2**) verwendet. Nach dem Auftauen der tiefgefrorenen Bakterienaliquots wurden die Bakterien mit dem jeweiligen Zellkulturmedium gewaschen (5 min, 2700 g) und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die tatsächlich verwendete Keimzahl wurde jeweils durch serielles Ausplattieren überprüft.

2.2.1.2 Herstellung von Bakterienstocks

Zur Herstellung von Bakterienstocks wurde der jeweilige Bakterienstamm auf Columbia-Blutagarplatten kultiviert, nach 5 d mit Wattestäbchen abgenommen, in PBS resuspendiert, anschließend mit PBS gewaschen, in Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei –80°C gelagert. Zur Bestimmung der Bakterienzahl wurden serielle Verdünnungsreihen auf Columbia-Blutagarplatten ausplattiert und nach 14 d ausgezählt.

2.2.1.3 Präparation von *outer membrane proteins* (OMPs)

Ziel dieser Methode war die Präparation von OMPs (22) der Bakterienstämme *B. henselae* Marseille und BadA$^-$. Alle Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt, alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C. Die Bakterienstämme

wurden nach dem Auftauen 5 d auf Columbia-Blutagarplatten kultiviert, mit sterilen Wattestäbchen abgenommen und in 20 ml PBS suspendiert. Ein Aliquot des Ansatzes wurde 1:10 mit PBS verdünnt und in eine Küvette überführt. Die optische Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm auf ungefähr 0,25 eingestellt, wobei eine OD=1 einer Bakterienanzahl von ca. 5x 10^8/ml entspricht. Der Ansatz wurde zentrifugiert (5 min, 3000 g, 4°C), in 10 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml eiskaltem 0,2 M TrisHCl / 1 mM $MgSO_4$, pH 8,0 aufgenommen und nochmals wie zuvor zentrifugiert. Nun wurde das Pellet in 5 ml 0,2 M TrisHCl, pH 8,0 resuspendiert und nacheinander 5 ml 1 M Saccharose / 0,2 M TrisHCl, pH 8,0, 20 µl 0,25 M EDTA, pH 8,0 und 18,75 µl Lysozym (100 mg/ml) zugegeben. Nach einem 1,5-stündigem Inkubationsschritt auf Eis erfolgte die Zugabe von 10 ml eiskaltem H_2O_{bidest} und eine weitere halbstündige Inkubation. Anschließend wurde eine Spatelspitze DTT zugegeben. Es folgte eine Ultraschallbehandlung (*output:* 5, *duty cycle:* 50%), die fünfmal jeweils 1 min auf Eis durchgeführt wurde, gefolgt von jeweils 1 min Pause. Nach einem erneutem Zentrifugationsschritt (20 min, 3000 g, 4°C) mit dem die Zelltrümmer abgetrennt wurden, wurde der Überstand in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (Beckman Optima LE-80K, SW 28 Rotor, 20 000 g, 2 h, 4°C). Das Pellet wurde in 17 ml 10 mM Hepes, pH 7,4 resuspendiert, 17 ml 1 % Sarcosyl / 10 mM Hepes zugegeben, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (2 h, 20 000 g, 4°C). Um die Proteine der inneren Membran abzutrennen, wurde das Pellet in 36 ml 0,5 % Sarcosyl / 10 mM Hepes resuspendiert und erneut bei 20 000 g und 4°C für 1 h zentrifugiert. Abschließend wurde das nun entstandene Pellet in 100 µl 10 mM Hepes resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Proteinbestimmung nach Bradford bestimmt. Ein Aliquot der entstandenen Proteinsuspension wurde mit einer gleichen Menge 2x Laemmli-Puffer verdünnt, 5 min bei 95°C in einem Heizblock inkubiert und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.1.4 *B. henselae* Lipopolysaccharid

Das in dieser Arbeit verwendete LPS von *B. henselae* wurde freundlicherweise von Dr. Urs Zähringer, Borstel, zur Verfügung gestellt (161). Für die Kontrollexperimente wurde in dieser Arbeit LPS von *S. minnesota* (Lipopolysaccharide ultra pure *Salmonella minnesota* R595, Calbiochem, La Jolla, USA) verwendet.

2.2.2 Zellkultur

Für die Zellkulturexperimente dieser Arbeit wurden humane Endothelzellen (HUVECs, *human umbilical vein endothelial cells*) und HeLa 229 Zellen (ATCC, Rockeville, MD, USA) verwendet. Bei HeLa 229 handelt es sich um eine humane Epithelzelllinie, die von einem stark proliferierenden Zervixkarzinom abstammt und speziell für experimentelle Zwecke kultiviert wurde.

2.2.2.1 Kultivierung

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, Materialien und Lösungen wurden bereits steril vom Hersteller bezogen oder sterilfiltriert. Die Zelllinien wurden im Zellkultur-Brutschrank bei 37°C, 5 % CO_2 sowie bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturmedium (**Tab. 5**) in Zellkultur-Flaschen. Endothelzellen wurden in mit Kollagen G beschichteten Zellkulturflaschen und –platten kultiviert. Hierfür wurde Kollagen G in einem Verhältnis von 1:40 mit PBS verdünnt und in einer finalen Konzentration von 0,1 mg/ml über Nacht auf die Flaschen- und Plattenböden aufgebracht. Das Kollagen wurde abgesaugt und die beschichteten Zellkulturgefäße bei 4°C aufbewahrt.

Zur Kultivierung wurden die Zellen nach dem Auftauen in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen am Flaschenboden bildete sich innerhalb weniger Tage ein konfluenter Zellrasen aus. Um die adhärenten Zellen vom Flaschenboden abzulösen wurden sie nach kurzem Waschen mit Trypsin/EDTA-Lösung für 2-5 min bei 37°C mit 3-5 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Dadurch werden Adhäsionsproteine der Zelloberfläche gespalten, worauf sich die Zellen leicht vom Flaschenboden ablösen lassen. Das Trypsin/EDTA wurde anschließend durch die Zugabe der 3-4-fachen Menge Zellkulturmedium inaktiviert. Je nach Bedarf wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:10 in neuen Flaschen weiterkultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle 3 d erneuert.

2.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in Suspension wurde ein Aliquot der abgelösten Zellen mit Trypan-Blau verdünnt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der lebenden (ungefärbten) Zellen bestimmt. Hierzu wurden die 4 äußeren Eckquadrate der Zählkammer ausgezählt, der Mittelwert gebildet und mit

dem Kammerfaktor (1x 10^4/ml) und dem Faktor der Verdünnung mit Trypan-Blau multipliziert. Hieraus ergab sich die Anzahl der Zellen in der Zellsuspension pro ml.

2.2.2.3 Infektionsexperimente

Zur Durchführung von Infektionsexperimenten wurden die benötigten Zellen am Tag vor dem geplanten Experiment wie beschrieben vom Zellkulturflaschenboden abgelöst und die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Die zum Ablösen der Zellen verwendete Trypsin-EDTA Lösung wurde durch Zentrifugieren und Resuspendieren der Zellen in Zellkulturmedium entfernt. Anschließend wurden die Zellen in der definierten Menge in Zellkulturplatten ausgesät.

Am Tag der Infektion wurde zwei Stunden vor dem geplanten Infektionszeitpunkt das Zellkulturmedium abgesaugt und durch antibiotikafreies Medium ersetzt. Infektionsexperimente zur Bestimmung von Zytokinen und Adhärenz wurden außerdem mit Zellkulturmedium ohne FCS durchgeführt. Die benötigten Aliquots der *B. henselae*-Bakterienstocks wurden zügig aufgetaut, zentrifugiert (5 min, 2700 g, RT) und einmal mit Medium gewaschen. Die Bakterien wurden in der gewünschten Konzentration auf die Zellen gegeben. Die Infektionsexperimente wurden mit einer MOI *(multiplicity of infection)*, also einer Bakterienzahl pro Zelle, von 100, 250 und 500 durchgeführt. Die errechnete MOI wurde durch serielle Verdünnungsreihen, Ausplattieren und Auszählen der CFU (*colony forming unit*) verifiziert. Zur Verbesserung der Bakterien-Zell-Kontakte wurden die Zellkulturplatten anschließend zentrifugiert (5 min, 300 g, RT). Danach wurden die Kokulturen im Zellkulturbrutschrank inkubiert.

Als Negativkontrollen dienten in allen Infektionsexperimenten Zellen, die mit reinem Medium inkubiert wurden, als Positivkontrollen Zellen, die mit DFO (200 µM) oder PMA (25 ng/ml) inkubiert wurden.

2.2.2.4 Infektionsexperimente zum Nachweis der Adhärenz von *B. henselae*

Zum quantitativen Nachweis von adhärenten Bakterien auf der Zelloberfläche wurden HeLa-Zellen und HUVECs parallel im 24-well Format kultiviert und mit *B. henselae* (MOI 250) infiziert. Nach 30 min wurde der Zellkulturüberstand entfernt. Nicht adhärente Bakterien wurden entfernt, indem die Zellen dreimal mit warmem Zellkulturmedium gewaschen wurden. Anschließend erfolgte die osmotische Lyse der

Zellen, indem jeder Ansatz 3-5 min mit 900 µl H_2O_{bidest} inkubiert wurde. Unter mikroskopischer Kontrolle erfolgte die Beurteilung der Lyse, die durch Zugabe von 100 µl 10x PBS zum Stillstand gebracht wurde. Die lysierten Zellen wurden mit einer Pipette gut resuspendiert (85). Zur Bestimmung der Anzahl der adhärenten Bakterien wurden serielle Verdünnungsreihen der Zellsuspension hergestellt und auf Columbia-Blutagarplatten ausplattiert. Nach ungefähr 3 Wochen konnte die CFU ausgezählt werden. Zum exakten Nachweis der Adhärenzrate wurden Dreifachbestimmungen aller Ansätze durchgeführt und Mittelwerte gebildet.

2.2.3 Analyse der Funktion von BadA-Domänen

In dieser Arbeit wurden Teile der Kopf- und Stiel-Domäne von BadA auf ihre biologische Aktivität untersucht. Hierfür wurde die $BadA_{Kopf}$-Domäne (~42 kDa, AS 48-376) rekombinant in *E. coli* exprimiert (Dr. Tanja Riess, nicht publiziert) und die dabei gebildeten Einschlusskörperchen mit Hilfe einer Ni^{2+}-Sepharose Säule gereinigt (Dr. Dirk Linke, Max-Planck-Institut für Entwicklungbiologie, Tübingen, nicht publiziert). Dazu wurden die Einschlusskörperchen in wenig Wasser resuspendiert und dann in 6M Guanidin-HCl, 500 mM Tris, 10% Glycerin pH 8 gelöst, auf eine 30 ml NiNTA Säule (XK 16, NiNTA HP von GE Healthcare) aufgetragen, einmal mit dem genanntem Puffer gewaschen und dann mit einem 0,5 mM Imidazolgradienten in dem genanntem Puffer eluiert. Die Rückfaltung erfolgte 1:20 verdünnt in 20 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl. Nach erfolgter Dialyse gegen den Rückfaltungspuffer wurden die Präzipitate zentrifugiert und die $BadA_{Kopf}$-Domäne bei 4°C gelagert.

Bei der $BadA_{Stiel}$-Domäne handelt es sich um ein kleines Fragment aus dem Übergang vom Kopf zum Stiel (~18 kDa, 480 bp, AS 377-539), das in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt wurde (131). Der Nachweis der BadA-Domänen erfolgte jeweils mit einem spezifischen Antikörper [**2.2.3.2**, (82)].

2.2.3.1 Zellkulturexperimente mit BadA-Domänen

Die biologische Aktivität der BadA-Domänen wurde nach Zugabe der gereinigten Proteine zu Epithel- und Endothelzellen untersucht.

Zum Nachweis der Adhärenz der BadA-Domänen wurden $BadA_{Kopf}$ und $BadA_{Stiel}$ jeweils in einer Konzentration von 5 bzw. 10 µg/ml in 6-well Zellkulturplatten mit HUVECs bzw. HeLa-Zellen gegeben. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 300 g, RT) und der Ansatz 4 h im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach Abnehmen des Zellkulturüberstandes wurde durch dreimaliges Waschen mit warmem Zellkulturmedium ungebundenes Protein eliminiert. Anschließend wurden Ganzzellextrakte hergestellt. Der Untersuchung der Adhärenz erfolgte durch Nachweis der Domänen im Ganzzelllysat durch im Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper (**2.2.5.5**).

Zur Untersuchung der Zytokininduktion von HeLa-Zellen bzw. HUVECs nach Zugabe von gereinigten BadA-Domänen wurden nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 h in 24-well Zellkulturplatten Zellkulturüberstände gewonnen und auf ihren Gehalt an VEGF und IL-8 mittels ELISA untersucht.

2.2.3.2 Generierung eines $BadA_{Kopf}$-spezifischen Antikörpers

Zur Detektion der $BadA_{Kopf}$-Domäne wurde ein $BadA_{Kopf}$-spezifischer Antikörper generiert (Riess & Kempf, nicht publiziert). Dazu wurde eine Maus (C57BL6) dreimalig, jeweils im Abstand von 10 d, mit 25 µg aufgereinigtem $BadA_{Kopf}$-Protein unter Zugabe von inkomplettem Freund´schen Adjuvans, das aus hitzeinaktivierten Mykobakterien, metabolisierbarem Mineralöl und einem Emulgator besteht, zur Verbesserung des immunstimulierenden Effekts immunisiert (intraperitoneale Applikation). Nach 10 d wurde das Blutserum der Maus isoliert und bei -80°C gelagert. Die Reaktivität des generierten Antikörpers wurde im Western Blot überprüft.

2.2.4 Färbungen

Die Detektion von Antigenen ist durch Bildung von Antigen-Antikörper Komplexen mit Hilfe von Fluoreszenz-Farbstoff markierten Antikörpern möglich. So können Bakterien und Zellen anhand von spezifischen Oberflächenproteinen sichtbar gemacht werden.

2.2.4.1 Doppelimmunfluoreszenz (DIF)

Die Doppelimmunfluoreszenz diente in dieser Arbeit zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Infektionsverlaufs. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass die

Zellmembran viabler Säugerzellen für Antikörper undurchlässig ist, aber mit Hilfe von Detergenzien permeabel gemacht werden kann (66). Durch eine sequentielle Färbung mit verschiedenen Antikörpern, bei der zunächst die extrazellulären Bakterien und dann in einem zweiten Schritt nach der Lyse der Zellen die extra- und intrazellulären Bakterien gefärbt werden, kommen die unterschiedlichen Farbsignale zustande.

HUVECs wurden am Tag vor der geplanten Infektion auf Glasobjektträger ausgesät, die zuvor mit Kollagen G wie oben beschrieben beschichtet wurden. Die Zellen wurden mit *B. henselae* WT und BadA$^-$ infiziert (MOI 250) und nach 6 h dreimal mit Zellkulturmedium gewaschen und mit 3,75 %-iger PFA-Lösung fixiert (15 min, 4ºC). Zu Beginn der Färbung wurden die fixierten Coverslips dreimal mit PBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde nach jedem Inkubationsschritt wiederholt, um überschüssige Reagenzien zu entfernen. Alle Inkubationsschritte wurden bei RT und unter Lichtabschluss durchgeführt.

Die fixierten Zellen wurden zunächst 15 min mit 0,1 %-igem BSA in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (anti-*Bartonella,* 1:250 in PBS) und einem FITC-konjugiertem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG, 1:100) jeweils eine Stunde inkubiert. Hierdurch wurden die extrazellulären Bakterien grün gefärbt. In einem nächsten Schritt wurde die Zellmembran mit 0,1 %-igem Triton X-100 (15 min, RT) permeabilisiert, um das Aktin-Skelett und die intrazellulären Bakterien zu erreichen. Die Zellen wurden erneut mit BSA blockiert. Es folgte wiederum die Inkubation mit dem Primärantikörper (s. o.), diesmal außerdem unter Zugabe von TRITC-konjugiertem Phalloidin (1:1000) zur roten Anfärbung des Aktin-Skeletts. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy5-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper (1:100) verwendet, der die intrazellulären Bakterien blau anfärbte. In allen Experimenten wurde zusätzlich die DNA der Zellkerne mittels DAPI (1 µg/ml) angefärbt (10 min, RT).

Schließlich wurden die gefärbten Coverslips mit Mountainmedium eingedeckt, auf Objektträger aufgebracht und mit Entellan umschlossen. Die Analyse der Proben erfolgte unter dem konfokalen Laserscan-Mikroskop, mit dem gleichzeitig vier

verschiedene Fluorochrome auf vier Kanälen detektiert werden können: grün (FITC), rot (TRITC), blau (Cy5) und hellblau (DAPI). Die Fluoreszenzbilder wurden im sequentiellen Modus erstellt und anschließend digital mit Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

Zum Nachweis von Proteinen, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, wurde in dieser Arbeit der Western Blot gewählt. Hierbei können Proteine mit einer spezifischen und sehr sensitiven Antikörperreaktion nachgewiesen werden.

2.2.5.1 Präparation von Proteinextrakten für Western Blot mit Laemmli-Puffer

HeLa-Zellen bzw. HUVECs wurden in 6-well-Zellkulturplatten mit *B. henselae* infiziert. Nach dem jeweiligen Inkubationszeitraum wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen dreimal mit warmem Zellkulturmedium gewaschen, um die freien Bakterien zu entfernen. Die Lyse der Zellen erfolgte unter Zugabe von 100 µl 2x Laemmli-Puffer (**Tab. 7**). Das entstandene Zell-Lysat wurde für 3-5 min bei 98°C inkubiert, anschließend zentrifugiert (5 min, 20 000 g, 4°C) und bei –80°C gelagert.

2.2.5.2 Präparation von Proteinextrakten zur Bestimmung von HIF-1α

Zur Untersuchung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 wurden Proteinextrakte mit Hilfe eines speziellen Extraktionspuffers zur Zelllyse (**Tab. 6**) hergestellt, da die HIF-1α Untereinheit sehr instabil ist.

HeLa-Zellen bzw. HUVECs wurden einen Tag vor Infektion ausgesät und über Nacht inkubiert. 6 h nach Infektion mit *B. henselae* wurden die HeLa-Zellen zweimal mit eiskaltem PBS, die HUVECs zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen, anschließend wurden 250 µl Lysepuffer pro Ansatz zugegeben. Das Zelllysat wurde mit Hilfe eines Zellschabers vom Zellkulturplattenboden abgelöst, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation bei 4°C wurden die Proben 5 sec bei maximaler Geschwindigkeit mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurden die Lysate 10 min bei 70°C in einem Heizblock inkubiert und bis zur weiteren Analyse bei –80°C gelagert.

2.2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 im sauren Milieu an Proteine, wobei es zu einer Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form) kommt. Dabei korreliert die Menge an Protein mit der Absorption bei 595 nm, so dass eine Quantifizierung des Proteingehalts einer Lösung möglich ist.

Die zu vermessenden Proben wurden jeweils mit $H_2O_{dest.}$ 1:50, 1:75, 1:100 und 1:200 auf ein Endvolumen von 80 µl verdünnt und in eine 96-well-Zellkulturplatte überführt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine lineare BSA-Verdünnungsreihe von 0-80 µg/ml hergestellt. Nach Zugabe von 20 µl Färbereagenz zu den vorgelegten Proben bzw. der Standardverdünnung und Mischen auf dem Mikrotiterplatten-Schüttler wurde nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT die Absorption bei 595 nm im ELISA-Reader bestimmt. Um eine möglichst genaue Aussage über die in der Probe vorhandene Proteinmenge zu erhalten, wurden die einzelnen Werte der Verdünnungen gemittelt und mit einem Leerwert (nur H_2O_{dest}) abgeglichen.

2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei diesem Verfahren werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse getrennt. SDS als anionisches, amphiphatisches Detergens bindet im Verhältnis 1:1,4 pro Aminosäure an die kationischen Reste der Proteine und verleiht ihnen damit eine negative Überschussladung, die sich proportional zur Größe des Proteins verhält und die die eigene Ladung der Proteine vernachlässigbar macht. Darüber hinaus nehmen alle SDS-denaturierten Proteine eine stäbchenförmige Konformation ein, so dass der Einfluss der nativen Oberflächenstruktur auf die Wanderungseigenschaften der Proteine aufgehoben wird. Die Proteine wandern daher im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihr Laufverhalten während der Elektrophorese ausschließlich von ihrer Größe abhängt. Die Trennung der Proteine im Gel erfolgt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes (41), wobei der Trennbereich über die Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentrationen im Gel kontrolliert werden kann. Die Acrylamid-Konzentration kann zwischen 2 % und 30 % variieren und bestimmt die Porengröße des Gels. Sehr große Proteine werden mit niedrig konzentrierten Gelen (0,1 % Bisacrylamid, 3-4 %

Acrylamid) getrennt, sehr kleine Proteine benötigen stark vernetzte Gele (1 % Bisacrylamid, 20 % Acrylamid). Zur optimalen Darstellung von HIF-1α mit einer Molekülgröße von 120 kDa wurde ein Trenngel mit einer 8 %-igen Acrylamid-Konzentration gewählt.

Zuerst wurde das Trenngel (**Tab. 7**) in eine Vertikalgelkammer bis zu 2/3 des Endvolumens gefüllt und mit Ethanol (70 %) überschichtet, um eine glatte Trennfläche zu erhalten. Nach halbstündiger Polymerisation des Trenngels und der Entfernung des Ethanols wurde das Sammelgel (**Tab. 7**) in das verbliebene Volumen der Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach halbstündiger Polymerisation des Sammelgels erfolgte der Probenauftrag. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens mit 5x SDS-Probenpuffer (**Tab. 7**) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die mit Hilfe von SDS-Probenpuffer hergestellten Proben wurden unverdünnt eingesetzt. Die SDS-Elektrophorese nach Laemmli (94) wurde in 1x Laufpuffer (**Tab. 7**) bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel durchgeführt.

2.2.5.5 Western Blot

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine können aufgrund der negativen Ladung des gebundenen SDS elektrophoretisch weiter auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran übertragen werden, wobei das SDS im Laufe des Transfers abgetrennt wird. Anschließend können die transferierten Proteine durch eine spezifische und sehr sensitive Antikörperreaktion nachgewiesen werden (154) dabei können bis zu 0,1 ng Protein detektiert werden. Für den Proteintransfer von SDS-Gelen auf eine PVDF-Membran wurde diese Membran zunächst kurz in Methanol equilibriert und daraufhin für 2 min in $H_2O_{dest.}$ gewaschen. Anschließend wurden Gel und Membran übereinander gelegt und von beiden Seiten mit je einer Lage Whatman-Filterpapier und je einem Schwamm bedeckt. Diese Schichtung wurde in eine BioRad-Blotkammer eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte in Blot-Puffer (**Tab. 7**) bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA für 60 min.

Zum Fixieren der Proteinbanden wurde die Membran nach erfolgtem Blot kurz in Methanol getaucht und vor den weiteren Schritten luftgetrocknet. Die Effizienz des Transfers wurde durch reversible Proteinfärbung mit Ponceau Rouge S Lösung

überprüft. Dieser Farbstoff wurde durch Abspülen mit $H_2O_{dest.}$ anschließend wieder entfernt. Die PVDF-Membran wurde zur Blockierung von freien Bindungsstellen für 1-2 h bei RT in Blockierungspuffer (**Tab. 7**) auf einem Gelschüttler inkubiert. Nach Blockierung wurde sie über Nacht bei 4°C auf einem Gelschüttler mit dem jeweiligen Primärantikörper (1:1000, verdünnt in Blockpuffer) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (5 min, RT) der Membran mit Waschpuffer (**Tab. 7**) wurde die Membran mit einem Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Sekundärantikörper (1:1000, verdünnt in Blockierungspuffer) für 1 h auf einem Gelschüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen (3× 5 min mit Waschpuffer) wurde die Membran mit ECL-Reagenz versetzt und zwischen zwei Tageslichtprojektor-Folien in eine Entwicklerkassette gelegt. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde im Dunkeln für einige sec bis min ein Röntgenfilm eingelegt, der anschließend maschinell entwickelt wurde.
Eine andere Möglichkeit zur Detektion der Antikörperbindung besteht in der Zugabe von DAB-Entwicklungslösung. Dazu wurde die Membran wie oben beschrieben mit Primärantikörper und dem Meerrettich-Peroxidase konjungiertem Sekundärantikörper inkubiert. Schließlich erfolgte die Zugabe von Substratpuffer mit DAB (**Tab. 8**) und Inkubation des Western Blots, bis die Banden wunschgemäß in brauner Farbe sichtbar geworden waren, dann wurde Stoplösung zugegeben und abschließend die Membran mit H_2O gewaschen und lichtgeschützt getrocknet.

2.2.6 Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen

In dieser Arbeit wurde die IL-8 und VEGF Konzentration im Zellkulturüberstand von HeLa-Zellen und HUVECs mittels ELISA *(enzyme linked immunosorbent assay)* untersucht. Hierfür wurden die jeweiligen Zellen mit *B. henselae* infiziert bzw. mit bakteriellen Proteinen inkubiert, der Zellkulturüberstand abgenommen und mittels ELISA analysiert.

2.2.6.1 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Zur Gewinnung von Zellkulturüberständen wurden die Zellen in 24-, 48- oder 96-well Zellkulturgefäßen für 24 bzw. 48 h inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen, zur Entfernung störender Partikel zentrifugiert (20 000 g, 5 min, RT) und bis zur Analyse bei –20°C gelagert.

2.2.6.2 ELISA

Der ELISA ist ein oft angewandter und sehr sensitiver Immunoassay, mit dem sich Zytokine im Pikogrammbereich nachweisen lassen. Deshalb eignet sich dieser sehr gut zur Analyse von Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand. Das zu messende Zytokin bindet als Antigen an einen, an die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gebundenen, monoklonalen Primärantikörper im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion. In einem nächsten Schritt bindet ein hinzugegebener Sekundärantikörper ebenfalls an das Zytokin und katalysiert gleichzeitig eine Farbreaktion. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Zytokinkonzentration und kann photometrisch bestimmt werden. Anhand einer Standardkurve mit rekombinanten Zytokinen kann die absolute Konzentration ermittelt werden.

2.2.6.2.1 IL-8 ELISA

Zur Messung der Proteinmenge von IL-8 wurden die Vertiefungen der ELISA-Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C mit je 50 µl eines monoklonalen Primärantikörpers (3 µg/ml in 0,1 M Na_2HPO_4, pH 9) inkubiert (146). Überschüssige Antikörper wurden durch viermaliges Waschen mit Waschpuffer (**Tab. 9**) entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit Blockierungspuffer (**Tab. 9**) für 2 h bei RT blockiert. Nach erneutem viermaligen Waschen wurden 100 µl der jeweiligen Zellkulturüberstände in die einzelnen wells pipettiert. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe des rekombinanten humanen IL-8 (0-800 pg/ml, verdünnt in Kulturmedium). Die Bindung von IL-8 aus den Zellkulturüberständen an die in der ELISA-Platte gebundenen Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde erneut viermal gewaschen. Nach 1-2 h Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (0,5 µg/ml; 100 µl pro well) bei RT und anschließendem viermaligen Waschen wurden je 50 µl Konjugat (**Tab. 9**) auf die einzelnen wells verteilt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem letzten Waschschritt wurde PNPP in Substratpuffer (**Tab. 9**) zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml aufgelöst und pro well 50 µl pipettiert. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei 37°C im Dunkeln wurde die Zytokinkonzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einer Referenzwellenlänge von 490 nm mit dem ELISA-Photometer bestimmt.

2.2.6.2.2 VEGF-ELISA

Zum Nachweis von VEGF im Überstand wurde ein bereits mit monoklonalem Antikörper beschichteter ELISA (R&D Systems) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zu Beginn der ELISAs wurden 50 µl Verdünnungspuffer pro well pipettiert. Im Anschluss daran wurden 200 µl des Standards bzw. der Zellkulturüberstände hinzugefügt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der ELISA für 2 h mit 200 µl Konjugat inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal gewaschen. Danach wurden 200 µl Entwicklerlösung dazugegeben und nach einer 20-minütigen Inkubationszeit wurde die Entwicklung mit 50 µl Stopplösung beendet. Die Absorption wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 540 nm im ELISA-Photometer bestimmt und daraus anhand des Standards die jeweilige Zytokinkonzentration ermittelt.

2.2.7 Molekulargenetische Methoden

Da mRNA in den Zellkulturversuchen nur in geringer Quantität vorhanden war, wurde zur Quantifizierung der Genexpression in HUVECs zu einem bestimmten Zeitpunkt die Methode der RT-PCR mit anschließender semiquantitativer PCR oder quantitativer Real-Time-PCR (LightCycler) gewählt. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität erlaubt sie eine genaue Auswertung der zu untersuchenden mRNA.

2.2.7.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von RNA aus HUVECs wurde der RNeasy Mini Kit (QIAGEN) verwendet. Diese Methode der RNA-Isolierung basiert auf einer Variante der „single-step Methode“ (34). Dabei kann die RNA aus homogenisierten Zelllysaten an Silica-Gel-Membranen gebunden und mittels H_2O einfach eluiert werden. Da RNasen ubiquitär verbreitet sind und RNA relativ instabil ist, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Für die RNA-Isolierung und Reverse Transkription wurde DEPC-behandeltes Wasser verwendet, um die enthaltenen RNasen zu inaktivieren. Zur internern Kontrolle wurde jedes Experiment im Doppel angesetzt.

Für die Isolierung von RNA aus Gesamtzelllysat wurden die HUVECs in 6-well-Zellkulturplatten kultiviert. 6 h nach Infektion (MOI 250) wurde jeder Ansatz mit 300 µl

RLT-Puffer, der zuvor 1:100 mit β-Mercaptoethanol versetzt wurde, lysiert und mit einem Zellschaber vom Zellkulturplattenboden abgelöst. Das Lysat wurde in ein RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von je 300 µl 70 % Ethanol wurde die Suspension auf eine Säule gegeben und zentrifugiert (1 min, 20 000 g, 4°C). Anschließend wurde die Säule einmal mit RW1-Puffer (700 µl; 1 min, 20 000 g, 4°C) und zweimal mit RPE-Puffer (je 500 µl; 2 min, 20 000 g, 4°C) gewaschen. Nach einer halbstündigen Trockenzeit der Säule wurde die RNA mit 2x 10 µl RNase freiem Wasser in ein neues RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert (2 min, 20 000 g, 4°C) und bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt.

2.2.7.2 Quantifizierung der RNA

Um für das weitere Vorgehen von jeder Probe identische RNA-Mengen zu verwenden, wurde für jeden Ansatz individuell der RNA-Gehalt bestimmt, da die isolierte Gesamt-RNA-Menge in Abhängigkeit von der ursprünglichen Zellzahl in der Probe variiert.

Die photometrische Quantifizierung der RNA erfolgte bei 260 nm, da eine RNA-Lösung mit einer OD=1 eine Konzentration von 40 µg/ml besitzt. Als Nullwert diente 10 mM Tris, pH 8. Alle Proben wurden zur Vermessung 1:40 mit 10 mM Tris, pH 8 verdünnt. Der RNA-Gehalt der Probe errechnet sich wie folgt:

Gemessener OD_{260}-Wert x Verdünnungsfaktor 40 x 40 µg/ml.

Das Verhältnis aus den Absorptionswerten bei 260 nm und bei 280 nm (*absorbance ratio*) lieferte eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA und somit über die Qualität der Gesamt-RNA, wobei der optimale Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

2.2.7.3 Reverse-Transkriptase Reaktion (RT-PCR)

Für eine semiquantitative PCR bzw. eine quantitative Real-Time-PCR wurden die isolierten mRNA-Stränge einer Probe mittels des Enzyms *Reverse Transkriptase* in cDNA umgeschrieben. Diese wird dann ihrerseits mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Da sich die mRNA von anderen RNA Formen durch ein Ende mit mehreren aufeinanderfolgenden Adenin-Basen (Poly-A-Sequenz) unterscheidet, lässt sich diese spezifisch markieren, indem man DNA-Stränge aus Thymidin-Basen (Oligo-dT) zu den Proben gibt, die sich komplementär als Primer an

die Poly-A-Sequenz anlagern (*Primer Annealing*). An diesen Primer setzt nun die *Reverse Transkriptase* an und übersetzt den kompletten Strang in cDNA.

Für das *Primer Annealing* wurden 1-2 µg Gesamt-RNA auf 9 µl mit H_2O-DEPC eingestellt, je 1 µl Oligo dT-Primer (500 ng) zugegeben und für 10 min bei 65°C im Heizblock inkubiert. Für die Reverse Transkription wurden je 10 µl eines Mastermixes zu den Proben gegeben und 1 h bei 42°C und anschließend zur Inaktivierung der *Reversen Transkriptase* für 5 min bei 90°C inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde 1:10 mit H_2O-DEPC verdünnt und bei -20°C gelagert.

1x Mastermix:	4 µl	5x RT-Puffer
	1 µl	RNase-out (40 U)
	2 µl	DTT (0,1 M)
	2 µl	Nukleotide (10 mM)
	1 µl	SuperScript II Reverse Transkriptase (200 U)

2.2.7.4 Polymerase Kettenreaktion

Mit Hilfe der PCR kann man ein definiertes DNA-Fragment exponentiell amplifizieren. Dazu benötigt man zwei Oligonukleotidprimer, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren und dort aufgrund von komplementären Sequenzen hybridisieren können. Die PCR beruht auf drei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten (Denaturierung, Annealing, Polymerisation), die je nach Größe des zu erwartenden Amplifikons 20-35 mal hintereinander wiederholt werden (115). Durch die Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen gelöst, so dass im zweiten Schritt (Annealing) die Oligonukleotidprimer mit den komplementären Strukturen hybridisieren können. Während der Polymerisation erfolgt mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase (32) die Synthese neuer DNA-Fragmente komplementär zur vorhandenen DNA-Matrize. In dieser Arbeit wurden mittels semiquantitativer PCR DNA-Fragmente der Gene HK 2, MCP-1, ICAM-1 mit den entsprechenden Primern (**Tab. 2**) amplifiziert. Als interne Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Gen β-Aktin verwendet.

Für jede PCR wurde ein Mastermix auf Eis angesetzt und jeweils 45 µl dieses Gemisches zu 5 µl cDNA in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Die PCRs wurden in

einem PCR-Thermo-Cycler mit dem entsprechenden Programm (**Tab. 10**) durchgeführt.

1x Mastermix:	25,1 µl	H_2O
	5,0 µl	10x PCR-Puffer mit 15 mM $MgCl_2$
	1,0 µl	Nukleotide (10 mM)
	12,5 µl	Primer-Mix (je 20 µl Primer + 960 µl H_2O)
	0,4 µl	*Taq*-Polymerase (2 U)

Tab. 10: PCR-Programme der in dieser Arbeit eingesetzten semiquantitativen PCRs (83)

	Denaturierung	**Denaturierung, Annealing, Polymerisation**	**Ende**	**Pause**
β-**Aktin**	94°C-120s	94°C-60s, 72°C-150s, 22 Zyklen	72°C-5 min	4°C
HK 2	95°C-120s	94°C-30s, 58°C-50s, 72°C-50s, 10 Zyklen 94°C-30s, 58°C-50s, 72°C-50s, + 20 s je Zyklus, 15 Zyklen	-	4°C
ICAM-1	95°C-120s	95°C-30s, 59°C-30s, 72°C-60s, 19 Zyklen	72°C-120s	4°C
MCP-1	95°C-120s	95°C-30s, 61°C-30s, 72°C-60s, 16 Zyklen	72°C-120s	4°C

2.2.7.5 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Zur Quantifizierung der amplifzierten DNA-Fragmente wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt und anschließend mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, damit sie unter UV-Licht detektiert werden konnten (69). Der Vergleich der Bandenintensität untereinander erlaubte eine semiquantitative Aussage über die Protein-Expression in der Zelle zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion.

Die 50 µl PCR-Produkte wurden mit 5 µl Probenpuffer (OrangeG) versetzt und je 10 µl der Proben auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen, sowie 5 µl einer DNA-Leiter zur Kontrolle der Größe der PCR-Produkte. Die Gelelektrophorese erfolgte 45-90 min bei 90 V. Das Gel wurde anschließend 10-20 min in einer Ethidiumbromid Lösung (1 µg/ml) gefärbt, 10 min in $H_2O_{dest.}$ entfärbt und mit Hilfe einer

Geldokumentationsanlage fotografiert. Die Gelbilder wurden danach mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 digital bearbeitet

2.2.7.6 Quantitative PCR mittels Light-Cycler

Als weitere Methode zur Quantifizierung der Genexpression in einer Zelle wurde die Real-Time-PCR verwendet. Vorteil einer Quantifizierung mittels Real-Time-PCR im Vergleich zur semiquantitativen PCR ist, dass die Menge des entstehenden PCR-Produkts ständig während der PCR gemessen werden kann und somit in der linearen Phase der PCR-Reaktion eine Mengenbestimmung möglich ist, was zu genaueren Ergebnissen als bei der Endpunktmessung einer semiquantitativen PCR führt (70).
Die Quantifizierung der Real-Time-PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes (*threshold cycle*, C_T-Wert). Der C_T-Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Ab diesem Zeitpunkt ist die Amplifikation des PCR-Produktes exponentiell. Gleichzeitig werden in einem PCR-Lauf bekannte Matrizenmengen (Standard) amplifiziert, um eine Aussage über die Menge an Matrize zu einem bestimmten C_T-Wert machen zu können. Aus den bekannten Matrizenmengen kann eine Standardgerade erstellt werden, mit deren Hilfe man von einem bestimmten C_T-Wert auf die Matrizenkonzentration schließen kann. In dieser Arbeit wurde mittels Real-Time-PCR die Expression der Gene IL-8 und VEGF untersucht. Zur Bestimmung der IL-8-Genexpression wurde das Humane Interleukin-8 LightCycler™-Primer Set sowie als interne Kontrolle das Humane G-6-PDH LightCycler™-Primer Set (Roche) verwendet. G-6-PDH ist ein konstitutiv exprimiertes Gen in eukaryotischen Zellen. Sowohl für die IL-8- als auch für die G-6-PDH-Real-Time-PCR wurde ein Mastermix angesetzt, der in die LightCycler Kapillaren vorgelegt wurde. Danach wurden je 5 µl der unverdünnten cDNA zugegeben und der gesamte Ansatz kurz zentrifugiert. Als Standard wurden kommerzielle Standards nach Herstellerangaben eingesetzt.

1x Mastermix:	2 µl	Primer (10 µM)
	2 µl	LC-FastStart DNA Master SYBR Green I 10x (Roche)
	11 µl	H_2O

Als Reaktionsbedingung wurde für die IL-8- sowie für G-6-PDH-Real-Time-PCR folgendes Programm verwendet:

Denaturierung:	95°C, 10 min
Annealing:	Erniedrigung der Annealingtemperatur pro Zyklus um 0,5°C von 68°C auf 58°C, je 10 sec
Amplifikation:	72°C, 16 sec
Zyklenzahl:	45
Schmelzkurve:	von 58°C auf 95°C (kontinuierliche Temperaturerhöhung um 0,1°C/sec)

Im LightCycler™-Primer Set wird der fluoreszierende Reporterfarbstoff SYBR® - Green I verwendet, der sich unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagert und somit proportional zur Produktmenge ansteigt. Dadurch kommt es während der PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg, mit dessen Hilfe die Reaktion verfolgt werden kann.

Um zwischen korrektem Produkt, Artefakten oder Primerdimeren unterscheiden zu können, wird nach Beendigung der PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der es durch schrittweise Erhöhung der Temperatur zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge in Abhängigkeit von ihren Schmelzpunkten in ihre Einzelstränge kommt. Daraus folgt eine Abnahme der Fluoreszenz, die aufgezeichnet wird. Da die Produkte von Primerdimeren und Artefakten bei niedrigeren Temperaturen schmelzen als die Produkte der Ziel-DNA, kann somit zwischen korrektem Produkt, Primerdimeren bzw. Artefakten unterschieden werden.

Zur Bestimmung der VEGF-Gen-Expression mittels Real-Time-PCR wurden synthetisierte TaqMan-Sonden (TIB Molbiol, Berlin) verwendet. Als interne Kontrolle diente das konstitutiv exprimierte Gen β_2-Microglobulin. Bei einem TaqMan-Assay liegt zwischen den zwei spezifischen Oligonukleotiden ein weiteres fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (TaqMan-Probe). Unter einer TaqMan-Probe versteht man eine Sonde, die am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende oder intern mit einem Quencher-Farbstoff markiert ist (100). Bei einer intakten Sonde wird die Reporter-Fluoreszenzemission durch die Nähe des Quenchers zum Reporter unterdrückt. Kommt es nun während der Reaktion zur Neustrangsynthese, fragmentiert die *Taq*-Polymerase durch ihre 5'-3'-

Exonukleaseaktivität die TaqMan-Probe, woraus die Trennung des Reporters vom Quencher resultiert und somit die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird.

Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und ist proportional zur Menge der DNA-Matrize im Reaktionsgefäß. Da die *Taq*-Polymerase nur an TaqMan-Sonden bindet, die an die Zielsequenz gebunden sind, und nur diese fragmentiert, bleiben nicht hybridisierte Einzelstränge unbeschadet.

Zunächst wurde für die VEGF-Real-Time-PCR ein Mastermix A angesetzt.

1x Mastermix A:	
6,4 µl	$H_2O_{bidest.}$
6,0 µl	$MgCl_2$ (25 mM)
2,0 µl	10x PCR-Puffer
0,4 µl	dNTPs (je 10 mM)
0,3 µl	BSA (10 µg/µl)
0,15 µl	Platinum *Taq* (5 U/µl)

Dieser Mastermix A wurde auf drei Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und die dazugehörigen Primer (Endkonz.: 0,25 µM) sowie TaqMan Proben (Endkonz.: 0,1 µM) hinzugefügt.

1x Mastermix B:

VEGF		**β2-Microglobulin**		**Standard**	
Mastermix A	15,25 µl	Mastermix A	15,25 µl	Mastermix A	15,25 µl
Primer VEGFex3 f	0,7 µl	Primer B2M f	0,7 µl	Primer VEGFex3 f	0,7 µl
Primer VEGFex8 r	0,7 µl	Primer B2M r	0,7 µl	Primer VEGFex7ex5r	0,7 µl
Primer TM VEGFex3	0,4 µl	Primer B2M probe	0,4 µl	Primer TM VEGFex3	0,4 µl

Jeder Ansatz (VEGF, β2-Microglobulin, Standard) wurde im Doppel angesetzt. Pro LightCycler Kapillare wurden 17 µl des Mastermix B vorgelegt. In die VEGF- und β2-Microglobulin-Kapillaren wurde je 3 µl cDNA (1:8 in $H_2O_{bidest.}$ verdünnt) und zu den zwei Standardkapillaren je 3 µl der Standardverdünnung zugefügt.

Als Standard für die VEGF-Real-Time-PCR wurde ein Plasmid verwendet, das die Splicing-Variante 165 des VEGF-Gens enthält (157). Die Ausgangs-Konzentration

der Plasmide wurde auf eine Verdünnung von 10^6 Plasmiden/µl eingestellt. Um die absolute Kopienanzahl der Ziel-Transkripte zu bestimmen, wurde eine Standardgerade generiert. Bezogen auf diese Standardgerade wurde die Anzahl der Kopien der zu untersuchenden Proben anhand der LightCycler Software 3.1 ermittelt (157). Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	95°C-2 min	
Denaturierung:	95°C- 8 s	40 Zyklen
Annealing:	68°C-12 s	
Extension:	72°C-20 s	
	35°C-120 s	

Die Anzahl der amplifizierten Kopien wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Kopienanzahl des gesuchten Gens}}{\text{Kopienanzahl β2-Microglobulin}} \times 1000$$

2.2.8 Infektionsserologische Methoden zum Nachweis von *B. henselae*-Antikörpern in Patientenseren

Der IFT ist momentan die Standardmethode zum Nachweis von Antikörpern gegen *B. henselae* in Patientenseren. In dieser Arbeit wurde der IFT mit der neu etablierten Methode des Immunoblot zum Nachweis von Antikörpern verglichen. Hierfür wurden Patientenseren verwendet, die in der medizinischen Routinediagnostik zuvor bereits positiv auf Antikörper gegen *B. henselae* getestet worden waren und zum Teil freundlicherweise von Dr. Anna Sander, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt. Bei den negativen Kontrollseren handelt es sich um negativ auf *B. henselae*-Antikörper getestete Patientenseren, die der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen entstammen. Außerdem wurden einige Patientenseren verwendet, die zuvor positiv auf Antikörper gegen *Yersinia* spp. im Rahmen der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen, getestet worden waren. Dafür werden die WIDAL-Agglutinationsreaktion, ELISA und Western Blot eingesetzt. Die WIDAL-

Reaktion ist eine Agglutinationsreaktion, die zum Nachweis von Antikörpern mit bekannten Antigenen dient und die Angabe einer Titerstufe erlaubt. Sie dient mehr zum Nachweis akuter Yersiniosen, da der Agglutinationstiter verhältnismäßig schnell absinkt und wird als positiv bewertet, wenn der Titer mit >1:200 angegeben wird. Die WIDAL-Agglutinationsreaktion hat nach der Entdeckung von plasmid-kodierten Virulenzmarkern, den *Yersinia outer proteins* (Yops), etwas an Bedeutung verloren. ELISA und Western Blot werden mehr zum Nachweis länger zurückliegender oder chronischer Yersiniosen eingesetzt. Dabei werden im ELISA IgG- und IgA-Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica* nachgewiesen. Die Nachweisbarkeit von IgA-Antikörpern spricht meist für eine rheumatische Erkrankung. Bei einer akuten Yersiniose kommen IgA-Antikörper nur sehr früh in der Immunantwort vor und können meist nicht detektiert werden. Der Immunoblot weist IgG- und IgA-Antikörper gegen Yops nach, womit sicher die pathogenen *Yersinia* Stämme erfasst werden können. Dabei ist der Nachweis von Antikörpern gegen YopD oder gegen zwei andere Yops beweisend für eine abgelaufene Yersiniose.

2.2.8.1 IFT zum Nachweis einer *B. henselae* Infektion

Der IFT ist die diagnostische Standardmethode zum Nachweis einer Infektion mit *B. henselae* (127). Dabei werden Antikörper im Serum mittels indirektem IFT nachgewiesen. Das Probenmaterial wird geometrisch verdünnt und mit dem in einer Festphase fixierten Antigen inkubiert. Die im Serum enthaltenen spezifischen Antikörper werden an das fixierte Antigen gebunden, der Nachweis der Antikörperbindung erfolgt mit Hilfe von Fluorochrom-markierten Sekundärantikörpern in einem Fluoreszenzmikroskop. Als Titer wird die höchste Serumverdünnung mit deutlicher Fluoreszenz angegeben.

Zur Präparation von Antigen für den IFT wurde *B. henselae* in Gegenwart von Vero-Zellen (Nierenzellen der grünen Meerkatze) über 48 h angezüchtet, wobei die Bakterien sich auch intrazellulär vermehrten. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Lagerung der Aliquots bei -20ºC.

Zur Herstellung des IFT wurden 3 µl der hergestellten Antigenlösung des entsprechenden Bakterienstamms auf Objektträger aufgebracht, mit PFA/20 % Methanol fixiert und bei -20°C gelagert. Patientenseren, die zuvor bereits im IFT positiv für *B. henselae* Antikörper getestet waren oder negative Kontrollseren,

wurden mit PBS 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600 verdünnt, auf die Antigen-beschichteten Objektträger aufgebracht und 1 h bei RT inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal mit PBS gewaschen und unter Zugabe eines FITC-konjugierten Sekundärantikörpers (1:100) erneut eine Stunde unter Lichtabschluss bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte außerdem die Färbung der DNA mit DAPI (1 µg/ml, 10 min, 4°C). Die Beurteilung der Titerstufen erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop.

2.2.8.2 Western Blot zum Nachweis einer *B. henselae* Infektion

Der Nachweis von Antikörpern gegen *B. henselae* im Patientenserum sollte mit Hilfe von Western Blot-Analysen erfolgen. Dabei werden Antikörper-Bindungen auf Antigen-beladenen Filtermembranstreifen nachgewiesen.

Zur Herstellung der Membranstreifen wurde *B. henselae* 5 d auf Columbia-Blutagarplatten kultiviert, mit Wattestäbchen abgeerntet und in PBS suspendiert, einmal in PBS gewaschen, in eine Küvette überführt und bei einer Wellenlänge von 600 nm eine OD von 1 eingestellt. Die Ansätze wurden im Verhältnis von 1:1 in Laemmli-Puffer aufgenommen, 5 min bei 98°C im Heizblock inkubiert und zentrifugiert (2 min, 20 000 g, 4°C). Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet (**2.2.5.5).** Die Membranen wurden wie beschrieben mit Blockierungspuffer inkubiert und anschließend in Streifen geschnitten. Die Streifen wurden mit verschiedenen Verdünnungen (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, in Blockierugspuffer) von Patientenseren, die im IFT positiv auf *B. henselae* Antikörper getestet worden waren oder negative Kontrollseren, inkubiert (1 h, RT). Nach Inkubation mit Sekundärantikörper [anti-Human-Ig-HRP (Kaninchen), 1:1000] erfolgte die Detektion mit Hilfe von DAB-Entwicklungslösung.

2.2.9 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Die zu untersuchende Gruppe wurde jeweils mit der Kontrollgruppe verglichen. Zur Überprüfung der Gleichheit der Mittelwerte erfolgte eine Datenbewertung über den Student t-Test bzw. mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse. Die Differenz von Werten mit $p<0,05$ wurde als statistisch signifikant beurteilt. Bei ungleichen Varianzen wurde eine varianzstabilisierende Transformation durchgeführt. Die Ergebnisse werden mit den

entsprechend zuücktransformierten Mittelwerten zusammen mit deren 95% Vertrauensintervallen dargestellt.

Für **Abb. 8** wurde ein nichtlineares Dosis-Wirkungsmodell angepasst und die Parameter mit der Methode der kleinsten Quadrate geschätzt. Das Modell hat die Gleichung:

$$Il-8 = a + A\left(1+\exp(-\alpha c)\right).$$

Hierbei ist a die Zytokinkonzentration der Kontrolle, A der maximale Zuwachs für sehr hohe Konzentrentationen c von Außenmembranproteinen und α die Rate, mit der die maximale Wirkung erreicht wird.

Für **Abb. 9 B** wurde ebenfalls ein nichtlineares Dosis-Wirkungsmodell angepasst, dieses Modell hat die Gleichung:

$$Il-8 = p_0 + \frac{p_0 - p_1}{\left(1+\frac{K_{50}}{K}\right)^c}$$

Hierbei ist p_0 die Zytokinkonzentration der Kontrolle, p_1 die Zytokinkonzentration bei sehr hohen Konzentrationen c von Lipopolysaccharid, K_{50} ist diejenige Zytokinkonzentration, die bei der Hälfte zwischen minimaler und maximaler Zugabe von Lipopolysaccharid erreicht wird.

3 Ergebnisse

3.1 BadA-abhängige Interaktion von *B. henselae* mit humanen Endothelzellen

In dieser Arbeit wurde die Rolle von BadA bei der Infektion humaner Endothelzellen (ECs), die die eigentlichen Zielzellen einer *B. henselae*-Infektion darstellen (45), mit *B. henselae* untersucht. Dabei sollte die angiogenetische, HIF-regulierte von der entzündlichen, NFκB-regulierten Wirtszellantwort abgegrenzt werden. Zur Analyse der Rolle von BadA wurde neben *B. henselae* WT auch eine BadA-defiziente *B. henselae*-Transposonmutante verwendet (131).

3.1.1 BadA-abhängige Adhärenz an und Invasion in ECs

Zur Untersuchung der Rolle von BadA bei der Infektion von Endothelzellen wurden HUVECs mit *B. henselae* WT und BadA$^-$ infiziert und die Adhärenz und Invasion mittels CLSM analysiert. Dazu wurde eine DIF von *B. henselae* WT und BadA$^-$-infizierten HUVECs 6 h nach Infektion angefertigt.

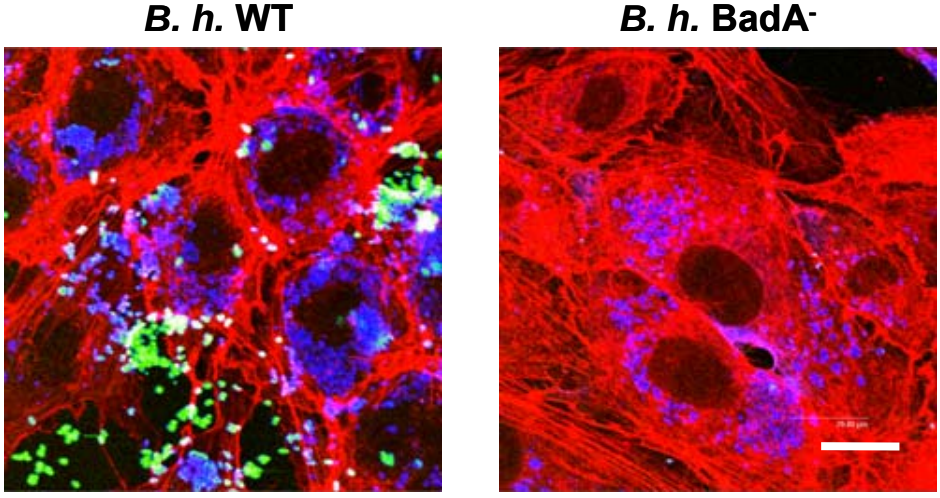


Abb. 4: BadA-abhängige Adhärenz an und Invasion in HUVECs. HUVECs wurden mit *B. henselae* WT und BadA$^-$ (MOI 250) infiziert, 6 h p.i. fixiert und mittels CLSM analysiert. Links: *B. henselae* WT-infizierte Zellen, rechts: *B. henselae* BadA$^-$-infizierte Zellen. Blau: intrazelluläre Bakterien, grün: extrazelluläre Bakterien, rot: Aktin, Skalierung: 20 µm.

Diese Färbemethode beruht auf der farblichen Unterscheidung von intra- und extrazellulären Bakterien infolge einer sequentiellen Antikörperfärbung, bei der zunächst die extrazellulären, adhärenten Bakterien mittels FITC-markiertem AK und nach der Zelllyse auch die intrazellulären Bakterien mittels Cy5-markiertem AK

angefärbt werden (66). Während 6 h nach Infektion mit *B. henselae* WT noch zahlreiche adhärente Bakterien (grün) detektierbar waren, ließen sich zum diesem Zeitpunkt kaum adhärente BadA-defiziente Bakterien nachweisen (**Abb. 4**). Zudem waren intrazellulär mehr Bakterien des Wildtyps als des BadA-defizienten Bakterienstamms nachweisbar (Daten nicht quantifiziert). Das Vorhandensein von BadA ist also essentiell für die Adhärenz von *B. henselae* an Endothelzellen und scheint auch für die Wirtszell-Invasion eine wichtige Rolle zu spielen.

3.1.2 Nachweis der BadA-abhängigen Aktivierung von HIF-1 in ECs

Der durch *B. henselae*-induzierten proangiogenetischen Wirtszellantwort in HUVECs liegt eine HIF-1-Aktivierung zugrunde (83). Um zu überprüfen, ob diese HIF-Aktivierung BadA-abhängig verläuft, wurden HUVECs mit *B. henselae* WT und BadA$^-$ infiziert und nach 8 h Gesamtzellproteinextrakte präpariert und anschließend ein HIF-1α Western Blot durchgeführt. Dabei aktivierte lediglich *B. henselae* WT HIF-1, während in *B. henselae* BadA$^-$-infizierten Zellen HIF-1α nicht detektiert werden konnte (**Abb. 5**). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die HIF-1-Aktivierung in Endothelzellen BadA-abhängig erfolgt.

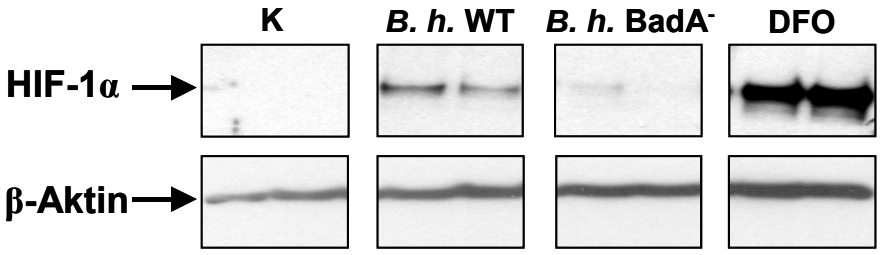


Abb. 5: BadA-abhängige Aktivierung von HIF-1 in HUVECs nach Infektion mit *B. henselae*. HUVECs wurden mit *B. henselae* WT und BadA$^-$ (MOI 500) infiziert und 8 h p.i. lysiert. Die HIF-1α-Untereinheit (120 kDa) wurde im Western Blot mit einem HIF-1α spezifischen Antikörper detektiert. Positivkontrolle: DFO-stimulierte Zellen (200 µM); interne Kontrolle: β-Aktin, K: nicht infizierte Zellen, *B. h*. WT: *B. henselae* WT-infizierte Zellen, *B. h.* BadA$^-$: *B. henselae* BadA$^-$-infizierte Zellen, DFO: DFO-stimulierte Zellen.

3.1.3 Analyse der BadA-abhängigen Geninduktion in ECs

In Folge einer *B. henselae*-Infektion kommt es in HeLa- und HUVEC-Zellen einerseits zu einer proangiogenetischen, HIF-1-regulierten Wirtszellantwort und andererseits zu einer inflammatorischen, NF-κB-dominierten Wirtszellantwort (83).

Weiterhin spielt BadA eine entscheidende Rolle in der Aktivierung einer proangiogenetischen Wirtszellantwort in *B. henselae*-infizierten HeLa-Zellen (131).
Um die Hypothese zu überprüfen, ob BadA bei der Infektion von Endothelzellen mit *B. henselae* für die proangiogenetische Wirtszellantwort essentiell ist, während die inflammatorische Wirtszellantwort BadA-unabhängig aktiviert wird, wurden HUVECs mit *B. henselae* WT und BadA$^-$ infiziert und 6 h nach Infektion die Genexpression auf RNA-Ebene analysiert. Mit semiquantitativer PCR wurde gezeigt, dass die Transkription des HIF-1-regulierten Gens Hexokinase 2 BadA-abhängig induziert wird (**Abb. 6A**). Für VEGF konnte mittels quantitativer Real-Time-PCR nach Infektion mit *B. henselae* WT eine 3,5-fach, nach Infektion mit *B. henselae* BadA$^-$ lediglich eine 1,5-fach stärkere Expression festgestellt werden (**Abb. 6A**).

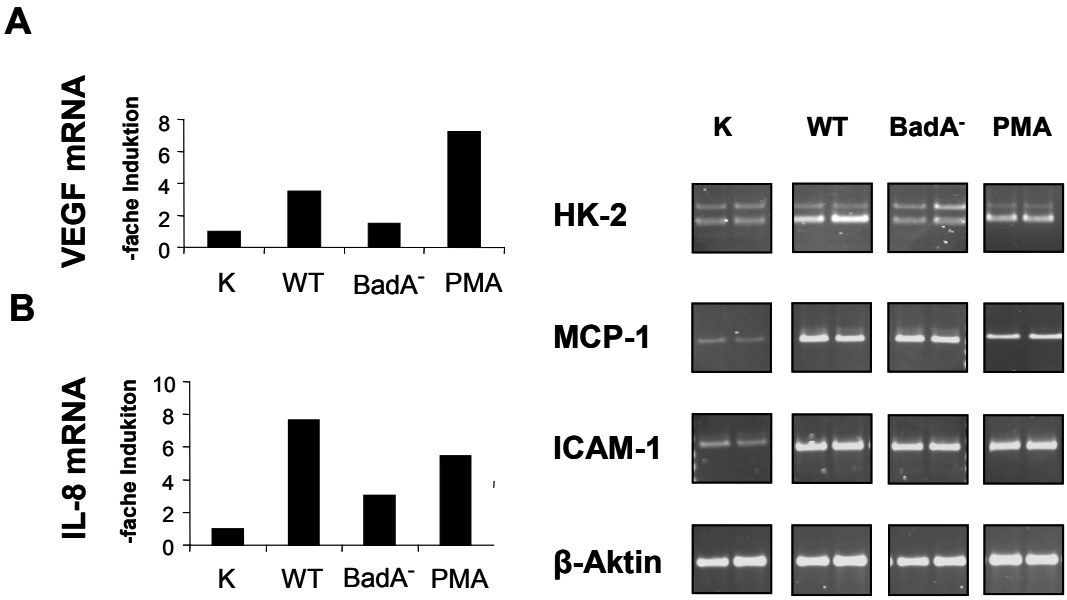


Abb. 6: Analyse der BadA-abhängigen Wirtszellantwort in HUVECs nach Infektion mit *B. henselae*. Induktion von Wirtszelltranskripten HIF-1- (**A**) und NF-κB- (**B**) regulierter Gene in HUVECs nach *B. henselae*-Infektion. 6 h nach Infektion (MOI 250) wurde mRNA extrahiert und in cDNA überschrieben. Die Geninduktion wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR (IL-8, VEGF) und semiquantitativer PCR (MCP-1, ICAM-1, HK 2) untersucht. Positivkontrolle: PMA-stimulierte Zellen (25 ng/ml); Interne Kontrolle semiquantitative PCR: β-Aktin; Interne Kontrolle Real-Time-PCR: β_2-Mikroglobulin; K: nicht infizierte Zellen, WT: *B. henselae* WT-infizierte Zellen, BadA$^-$: *B. henselae* BadA$^-$-infizierte Zellen, PMA: PMA-stimulierte Zellen.

Für die NFκB-regulierten Gene (147) MCP-1 und ICAM-1 konnte mittels semiquantitativer PCR gezeigt werden, dass die Transkription BadA-unabhängig induziert wird (**Abb. 6B**). Die Expression des u. a. NF-κB-regulierten Interleukin-8 (IL-8) wurde wiederum mit Hilfe von quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Hierbei

ergab sich nach Infektion mit *B. henselae* WT eine 7,7-fach stärkere Induktion, nach Infektion mit *B. henselae* BadA$^-$ eine 3,3-fach stärkere Induktion (**Abb. 6B**). Folglich wurde die BadA-Abhängigkeit der Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort nachgewiesen, während die Aktivierung einer entzündlichen, NF-κB-regulierten Wirtszellantwort zumindest für MCP-1 und ICAM-1 BadA-unabhängig stattfindet. Die Aktivierung von IL-8 dagegen verlief in Abhängigkeit der Expression von BadA, was in Übereinstimmung zu früher publizierten Ergebnissen steht (131).

3.1.4 Nachweis der BadA-abhängigen Aktivierung von p38 MAP-Kinase in ECs

In bakteriellen Infektionen wird die IL-8 Produktion der Wirtszelle posttranskriptionell reguliert, indem die IL-8-mRNA durch phosphorylierte p38 MAPK (pp38) stabilisiert wird (64,72). Es ist außerdem bekannt, dass es zu einer Aktivierung von pp38 in *B. henselae*-infizierten HeLa-Zellen kommt, diese jedoch nicht an einer posttranskriptionellen Regulation von VEGF in HeLa-Zellen beteiligt ist (83). Hier sollte untersucht werden, ob es zu einer BadA-abhängigen Aktivierung von pp38 in *B. henselae*-infizierten HUVECs kommt. HUVECs wurden mit *B. henselae* WT und BadA$^-$ infiziert. 30 min nach Infektion wurden Proteinextrakte hergestellt und anschließend im Western Blot die phosphorylierte p38 MAPK detektiert. Hierbei zeigt sich eine deutliche Zunahme der phosphorylierten p38 MAPK in *B. henselae* WT-infizierten Zellen im Gegensatz zu nicht infizierten Kontrollzellen und *B. henselae* BadA$^-$-infizierten Zellen (**Abb. 7**). Somit besteht eindeutig eine BadA-Abhängigkeit der Aktivierung von p38 MAPK in *B. henselae*-infizierten Endothelzellen.

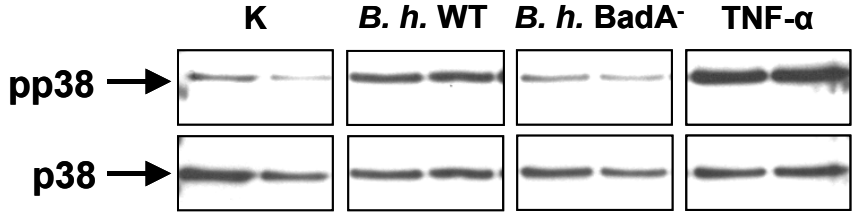


Abb. 7: BadA-abhängige Aktivierung von p38 MAPK (pp38) in HUVECs nach Infektion mit *B. henselae*. HUVECs wurden mit *B. henselae* WT und BadA$^-$ (MOI 250) infiziert oder mit TNF-α (50 ng/ml; Positivkontrolle) stimuliert und nach 15 min lysiert. Als interne Kontrolle wurde ein Western Blot gegen die nicht-phosphorylierte p38 MAPK (p38) durchgeführt. K: nicht infizierte Zellen, *B. h*. WT: *B. henselae* WT-infizierte Zellen, *B. h*. BadA$^-$: *B. henselae* BadA$^-$ -infizierte Zellen, TNF-α: TNF-α-stimulierte Zellen.

3.1.5 *B. henselae*-OMPs induzierte Zytokinsekretion in Endothel- und Epithelzellen

B. henselae-OMPs kommen eine bedeutende Rolle bei der Adhärenz von *B. henselae* an HUVECs zu (22). Um zu klären, welche Rolle OMPs bei der *B. henselae*-induzierten Zytokinsekretion zukommt, wurde die Sekretion von VEGF als Vertreter der proangiogenetischen Zytokine in HeLa-Zellen und von IL-8 als Vertreter der proinflammatorischen Zytokine in HUVECs analysiert. OMPs wurden aus *B. henselae* WT und BadA$^-$ präpariert und die Proteinkonzentration im Bradford-Assay bestimmt. HeLa-Zellen (VEGF) und HUVECs (IL-8) wurden nach Zugabe von OMPs über 48 h inkubiert und die jeweilige Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Eine Aktivierung von VEGF in HeLa-Zellen konnte weder nach Zugabe von aus *B. henselae* WT aufgereinigten OMPs noch nach Zugabe von aus *B. henselae* BadA$^-$ aufgereinigten OMPs detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen konnte nach Zugabe von *B. henselae* WT und BadA$^-$ OMPs zu HUVECs eine signifikante IL-8-Induktion, die sich mit Hilfe einer Dosis-Wirkungs-Kurve darstellen lässt, nachgewiesen werden (**Abb. 8**). OMPs induzieren also BadA-unabhängig eine proinflammatorische Wirtszellantwort in HUVECs, nicht jedoch eine proangiogenetische Zellantwort in HeLa-Zellen.

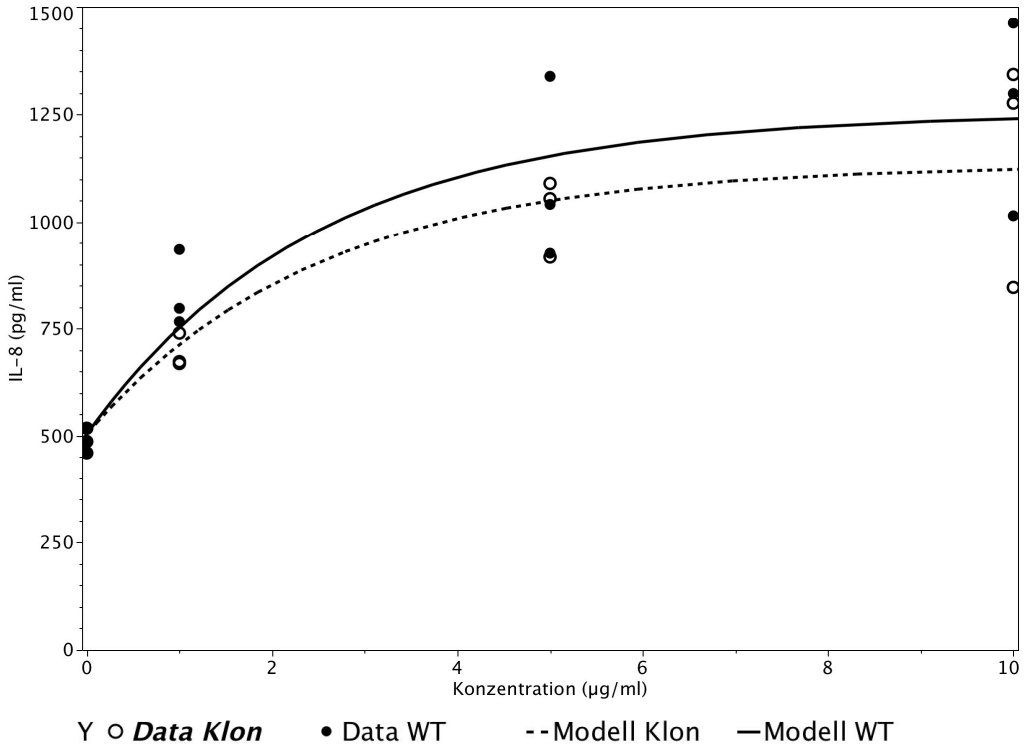


Abb. 8: Bestimmung der IL-8-Sekretion nach Inkubation von HUVECs mit OMPs. OMPs wurden aus *B. henselae* WT und BadA$^-$ präpariert und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt. HUVECs wurden über 48 h mit OMPs (1, 5 und 10 µg/ml) inkubiert und der Zellkulturüberstand im ELISA analysiert. Darstellung mit Hilfe eines nichtlinearen Dosis-Wirkungsmodells, Schätzung der Parameter mit der Methode der kleinsten Quadrate. Das Modell hat die Gleichung:

$$Il-8 = a + A\left(1+\exp(-\alpha c)\right)$$

Hierbei ist a die Zytokinkonzentration der Kontrolle, A der maximale Zuwachs für sehr hohe Konzentrentationen c von Außenmembranproteinen und α die Rate, mit der die maximale Wirkung erreicht wird.

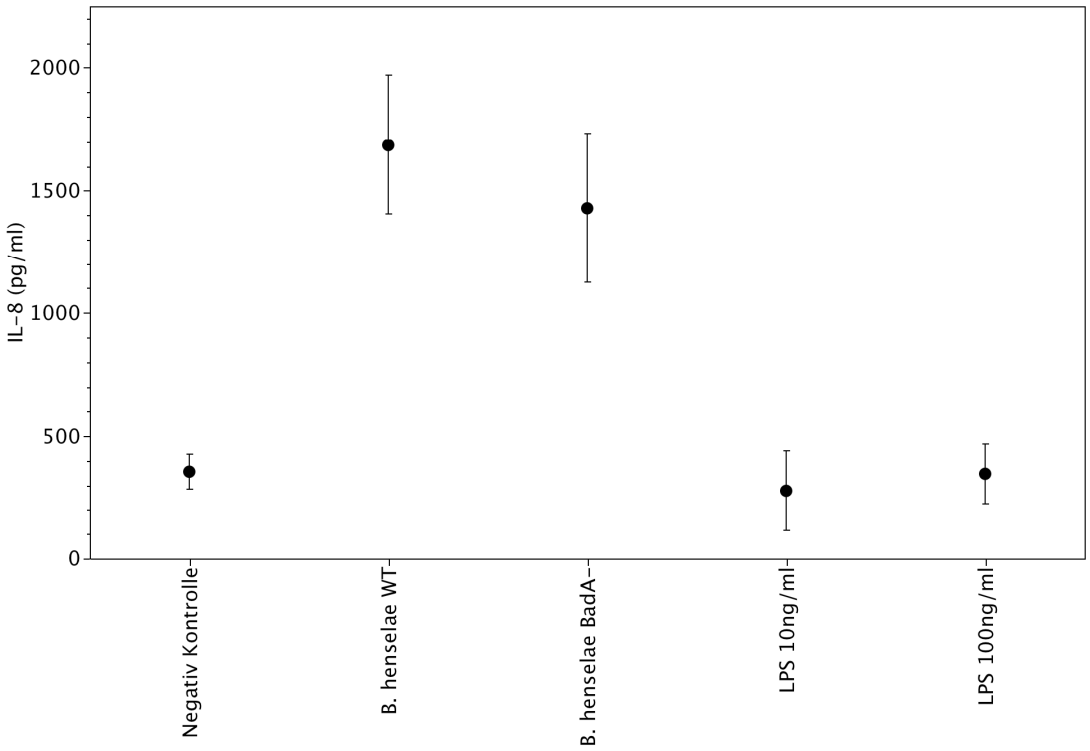
Parameter	Schätzwert	Untere 95% Vertrauensgrenze	Obere 95% Vertrauensgrenze
a	504	378	622
α	0.404	0.125	0.920
A_Typ_Klon	630	449	912
A_Typ_WT	750	567	1078

Data Klon = nach Inkubation mit OMPs aus *B. henselae* BadA$^-$ ermittelte Zytokinkonzentrationen, *Data WT* = nach Inkubation mit OMPs aus *B. henselae* WT ermittelte Zytokinkonzentrationen, Modell Klon/Modell WT = jeweils zugehöriges Dosis-Wirkungsmodell.

3.1.6 Einfluss von *B. henselae* Lipopolysaccharid auf die Induktion einer proinflammatorischen Wirtszellantwort in ECs

B. henselae LPS verfügt über eine geringe Endotoxizität (161) und hat soweit bekannt keine Bedeutung bei der Aktivierung einer proangiogenetischen Wirtszellantwort (83). Der Einfluss von LPS auf die Induktion einer proinflammatorischen Wirtszellantwort wurde anhand der IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand von HUVECs nach Inkubation mit LPS untersucht. Das verwendete *Bartonella*-LPS wurde aus *B. henselae* Houston-1 aufgereinigt und freundlicherwese von Dr. Urs Zähringer, Borstel, zur Verfügung gestellt. HUVECs wurden mit *B. henselae* WT und BadA$^-$ infiziert bzw. mit LPS (10 und 100 ng/ml) inkubiert, der Zellkulturüberstand wurde nach 24 h abgenommen und die Proteinkonzentration im ELISA bestimmt. Dabei stellt sich heraus, dass *B. henselae* WT und BadA$^-$ gleichermaßen zu einer jeweils signifikanten IL-8-Induktion führen, während LPS fast keinen Einfluss auf die IL-8 Sekretion hatte (**Abb. 9A**).

A



B

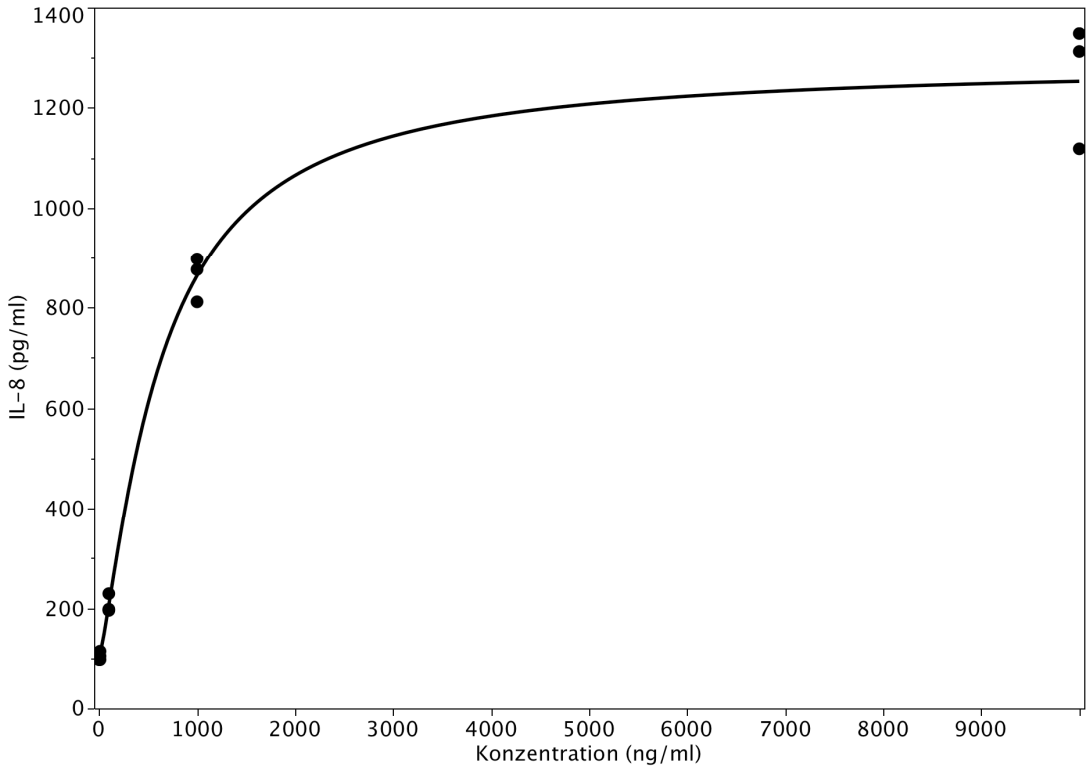


Abb. 9: Rolle von LPS bei der Induktion des NF-κB-regulierten Zytokins IL-8 in ECs. Analyse der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA. HUVECs wurden mit *B. henselae* (MOI 500) infiziert bzw. unter Zugabe von LPS von *B. henselae* (**A**, 10 und 100 ng/ml) und

von *S. minnesota* (**B,** 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml und 10 000 ng/ml) inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde nach 24 h abgenommen.

A: Analyse mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse. Die Zytokinkonzentration nach Infektion mit *B. henselae* WT und BadA- unterscheidet sich jeweils signifikant von der Negativkontrolle ($p < 0{,}0001$). Negativ Kontrolle: nicht infizierte Zellen, *B. henselae* WT: *B. henselae* WT-infizierte Zellen, *B. henselae* BadA-: *B. henselae* BadA- -infizierte Zellen, LPS: Zellen, die mit LPS in der jeweiligen Konzentration stimuliert wurden. **B:** Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen zugegebener LPS-Menge und der Zytokinkonzentration im Überstand mit Hilfe eines nichtlinearen Dosis-Wirkungsmodells, Schätzung der Parameter mit der Methode der kleinsten Quadrate. Das Modell hat die Gleichung:

$$Il-8 = p_0 + \frac{p_0 - p_1}{\left(1 + \frac{K_{50}}{K}\right)^c}$$

Hierbei ist p_0 die Zytokinkonzentration der Kontrolle, p_1 die Zytokinkonzentration bei sehr hohen Konzentrationen Lipopolysaccharid, K_{50} ist diejenige Zytokinkonzentration, die bei der Hälfte zwischen minimaler und maximaler Zugabe von Lipopolysaccharid erreicht wird.

Parameter	Schätzwert	Untere 95% Vertrauensgrenze	Obere 95% Vertrauensgrenze
p_0	100	93	108
p_1	1288	1157	1443
K_{50}	628	457	872
c	1.27	1.09	1.49

In entsprechenden Kontrollexperimenten, bei denen HUVECS mit LPS von *S. minnesota* stimuliert wurden, zeigte sich nach 24 h eine konzentrationsabhängige Induktion der IL-8 Sekretion (**Abb. 9B**). Demzufolge scheint *B. henselae* LPS keine Bedeutung bei der Induktion einer proinflammatorischen, NF-κB-vermittelten Wirtszellantwort in humanen Endothelzellen zuzukommen.

3.2 Funktionelle Analyse der $BadA_{Kopf}$- und $BadA_{Stiel}$-Domäne

BadA ist ein entscheidender Pathogenitätsfaktor von *B. henselae*. Es vermittelt Adhärenz an Wirtszellen und an extrazelluläre Matrixproteine (131), außerdem ist seine Expression wesentlich für die Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort. In dieser Arbeit sollten einzelne BadA-Domänen auf ihre Fähigkeit zur Adhärenz und Induktion einer angiogenetischen Wirtszellantwort untersucht werden.

3.2.1 Nachweis der Adhärenz der $BadA_{Kopf}$-Domäne an Endothel- und Epithelzellen

Die Kopf-Domänen der mit BadA verwandten, nicht-fimbriellen Adhäsine *Yersinia* Adhäsin A (YadA) und *Neisseria* Adhäsin A (NadA) sind für die Bindung an die extrazelluläre Matrix [YadA, (139)] und die Adhärenz an Epithelzellen [NadA, (25)] verantwortlich.

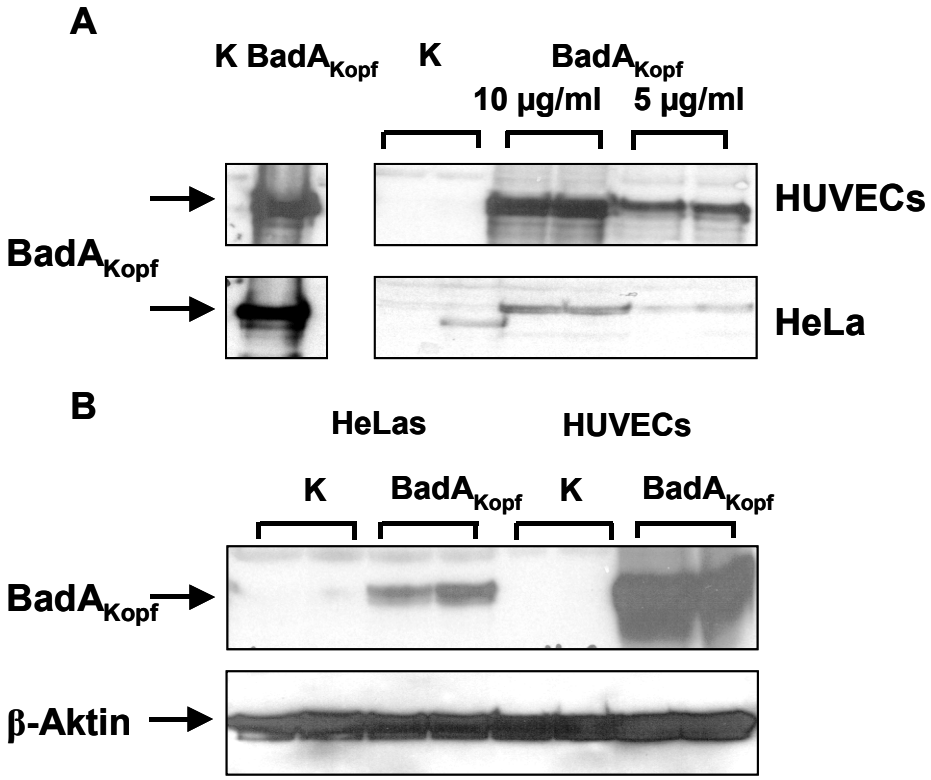


Abb. 10: Adhärenz der $BadA_{Kopf}$-Domäne an HUVECs und HeLa-Zellen. Die aufgereinigte $BadA_{Kopf}$-Domäne (42 kDa, 10 und 5 µg/ml) wurde zu HUVECs und HeLa Zellen gegeben. Nach 4 h wurden die Zellen zur Entfernung von freiem Protein gewaschen, lysiert und im Western Blot mit $BadA_{Kopf}$-spezifischem Antikörper analysiert. Darstellung der Dosisabhängigkeit der Adhärenz (**A**) und der Abhängigkeit der Adhärenz von der Zell-Linie (**B**). Interne Kontrolle: β-Aktin; K: Zellen, K $BadA_{Kopf}$: aufgereinigtes $BadA_{Kopf}$-Protein als interne Kontrolle im Western Blot, $BadA_{Kopf}$: mit $BadA_{Kopf}$ inkubierte Zellen.

Um zu untersuchen, ob die $BadA_{Kopf}$-Domäne an Epithel- und Endothelzellen bindet, wurde die ~42 kDa große $BadA_{Kopf}$-Domäne rekombinant in *E. coli* exprimiert (Dr. Tanja Rieß, nicht publiziert), die dabei entstandenen Einschlusskörperchen aufgereinigt und zurückgefaltet (Dr. Dirk Linke, nicht publiziert), die Proteinkonzentration im Bradford-Assay bestimmt und das $BadA_{Kopf}$-Protein in verschiedenen Konzentrationen zu HUVECs und HeLa-Zellen gegeben. Nach vierstündiger Inkubation wurden die Zellen gewaschen, um ungebundenes $BadA_{Kopf}$-Protein zu entfernen. Die Adhärenz der ~42 kDa großen $BadA_{Kopf}$-Domäne wurde

danach in Ganzzelllysaten mit einem spezifischen $BadA_{Kopf}$-Antikörper (Riess & Kempf, nicht publiziert) im Western Blot detektiert. Dabei zeigte sich eine deutliche, konzentrationsabhängige Adhärenz der BadA-Domäne sowohl an HUVECs wie auch an HeLa-Zellen (**Abb. 10A**). Im direkten Vergleich der beiden eingesetzten Zelllinien ließ sich eine deutlich stärkere Adhärenz des $BadA_{Kopf}$ an HUVECs als an HeLa-Zellen bei Einsatz der gleichen Zellzahl feststellen (**Abb. 10B**).

3.2.2 Quantifizierung der Adhärenz von *B. henselae* an Endothel- und Epithelzellen

Da die $BadA_{Kopf}$-Domäne stärker an ECs als an Epithelzellen adhäriert (**3.2.1**), sollte als nächstes analysiert werden, ob dies auch für die Adhärenz viabler *B. henselae* gilt. Dazu wurden HUVECs und HeLa Zellen mit *B. henselae* WT infiziert und 30 min nach Infektion die adhärenten Bakterien isoliert.

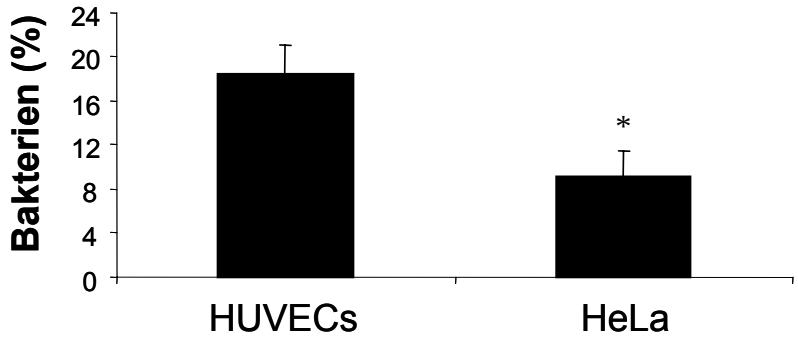


Abb. 11: Quantifizierung der Adhärenz von *B. henselae* an HUVECs und HeLa-Zellen. HUVECs und HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* WT (MOI 250) infiziert. 30 min p.i. wurde die Anzahl der adhärenten Bakterien durch Auszählen der CFU nach dreiwöchiger Kultivierung auf Columbia-Blutagarplatten bestimmt. Y-Achse: adhärente Bakterien (%) bezogen auf die gesamte eingesetzte Bakterienmenge (MOI 250). * Statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu HUVECs ($p<0,05$).

Deren Anzahl wurde durch Kultivierung von seriellen Verdünnungsreihen auf Columbia-Blutagarplatten und Auszählen der CFU bestimmt. Dabei zeigte sich eine signifikant stärkere Adhärenz von *B. henselae* an HUVEC- als an HeLa-Zellen, dargestellt als prozentualer Anteil der gesamten eingesetzten Bakterienmenge (**Abb. 11**). So adhärieren 18,5 % der eingesetzten Bakterien an HUVECs, im Gegensatz nur 9,1 % an HeLa-Zellen.

3.2.3 Nachweis der HIF-1-Aktivierung durch die $BadA_{Kopf}$-Domäne

HIF-1 wird in *B. henselae*-infizierten HeLa-Zellen (131) und HUVECs (**3.1.2**) BadA-abhängig aktiviert. Als Nächstes sollte analysiert werden, ob die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors durch die $BadA_{Kopf}$-Domäne erfolgen kann. Zur Detektion des HIF-1α Proteins im Western Blot wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* WT infiziert bzw. mit $BadA_{Kopf}$ inkubiert. 8 h nach Infektion bzw. Zugabe des Proteins wurden Proteinextrakte aus den Wirtszellen gewonnen und nachfolgend HIF-1-Western Blots durchgeführt. Dabei konnte im Gegensatz zu Kontrollzellen bei *B. henselae*-infizierten und bei mit $BadA_{Kopf}$-inkubierten Zellen die 120 kDa große HIF-1α-Untereinheit detektiert werden (**Abb. 12**). Daraus wird klar ersichtlich, dass HIF-1 durch Zugabe der aufgereinigten $BadA_{Kopf}$-Domäne aktiviert wird.

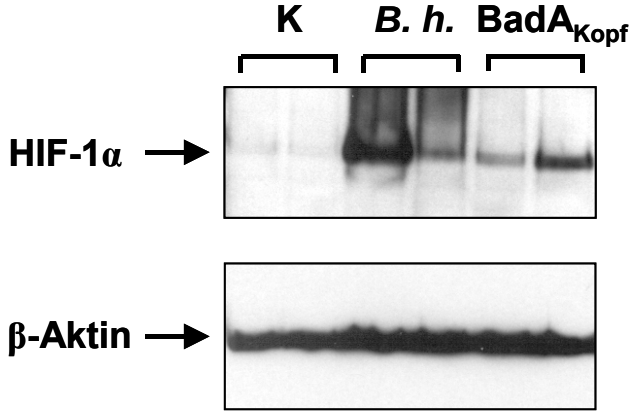


Abb. 12: Aktivierung von HIF-1 in HeLa-Zellen durch die $BadA_{Kopf}$-Domäne. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 500) infiziert bzw. nach Zugabe von aufgereinigtem $BadA_{Kopf}$ (10 µg/ml) inkubiert. Nach 8 h wurden die Zellen lysiert und das HIF-1α Protein (120 kDa) im Western Blot detektiert. Interne Kontrolle: β-Aktin, K: nicht infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae* WT-infizierte Zellen, $BadA_{Kopf:}$ mit aufgereinigtem $BadA_{Kopf}$ inkubierte Zellen.

3.2.4 Nachweis der $BadA_{Kopf}$-induzierten Zytokinsekretion

Die Tatsache, dass die $BadA_{Kopf}$-Domäne HIF-1 in Wirtszellen aktiviert, warf die Frage auf, ob die $BadA_{Kopf}$-Domäne auch VEGF im Sinne einer proangiogenetischen Wirtszellantwort und IL-8 im Sinne einer proinflammatorischen Zellantwort zu aktivieren vermag. Um dies zu analysieren, wurden HeLa-Zellen mit aufgereinigtem $BadA_{Kopf}$-Protein über 48 h inkubiert und die Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt **(Abb. 13)**. In gleicher Weise wurden HUVEC-Zellen behandelt und die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberstand bestimmt (**Abb. 13**). Es ergab sich eine signifikante VEGF- bzw. IL-8 Induktion bei

den mit $BadA_{Kopf}$-inkubierten HeLa-Zellen bzw. HUVECs im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollzellen.

Außerdem wurden HeLa- (VEGF) bzw. HUVEC- (IL-8) Zellen mit $BadA_{Kopf}$-Protein inkubiert, das zuvor mit Proteinase K behandelt worden war. Bei Bestimmung der Zytokinkonzentration im ELISA konnte gezeigt werden, dass es nach Zugabe von Proteinase K-behandeltem $BadA_{Kopf}$ weder zu IL-8- (HUVECs) noch zu VEGF- (HeLa-Zellen) Sekretion kommt. Es ist somit wahrscheinlich, dass es sich bei der $BadA_{Kopf}$-induzierten Zytokinsekretion um einen $BadA_{Kopf}$-spezifischen Effekt und nicht um einen unspezifischen Proteineffekt oder einen Effekt durch den mit dem $BadA_{Kopf}$ zu den Zellen gegebenen Lösungspuffer (50 mM NaCl, 20 mM Tris, pH8) handelt (**Abb. 13**).

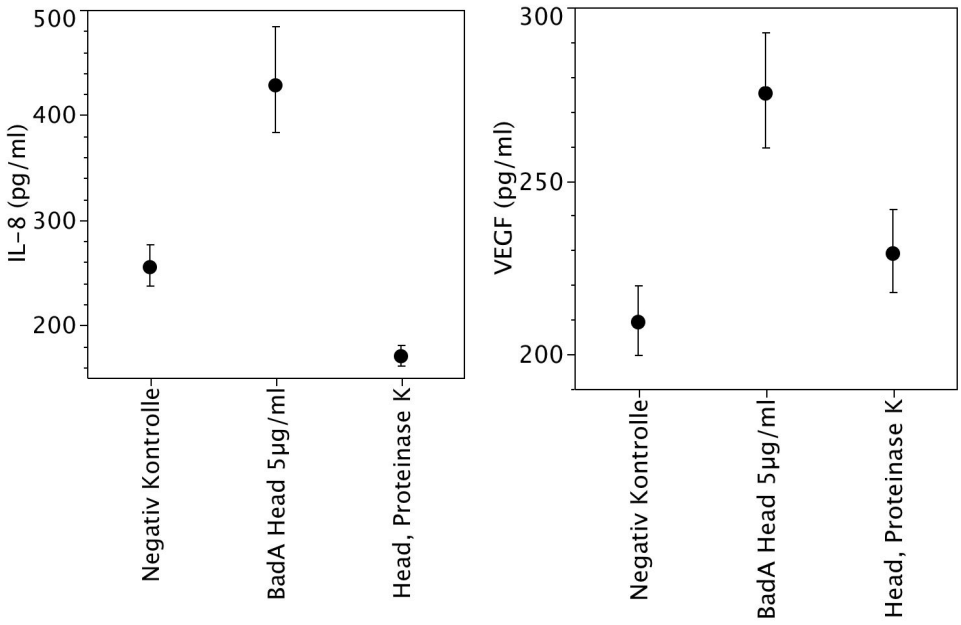


Abb. 13: $BadA_{Kopf}$-induzierten Zytokinsekretion. HUVECs (IL-8) bzw. HeLa-Zellen (VEGF) wurden über 48 h mit $BadA_{Kopf}$ bzw. mit Proteinase K-inaktiviertem (60 min, 200 µg/ml, 37°C) $BadA_{Kopf}$ (10 µg/ml) inkubiert. Die Zytokinkonzentration im Überstand wurde im ELISA bestimmt. Negativkontrolle: nicht infizierte Zellen, BadA Head: mit $BadA_{Kopf}$ inkubierte Zellen (5 µg/ml), Head Proteinase K: Zellen, die mit Proteinase K-inaktiviertem $BadA_{Kopf}$ (5 µg/ml) inkubiert wurden. Jeweils statistisch signifikante Induktion der IL-8 bzw. VEGF-Sekretion durch das $BadA_{Kopf}$ – Protein im Vergleich zur Negativkontrolle ($p<0,05$).

3.2.5 Funktionelle Analyse der $BadA_{Stiel}$-Domäne

Bei der in dieser Arbeit verwendeten $BadA_{Stiel}$-Domäne handelt es sich um ein ~18 kDa großes Fragment aus dem BadA-Stiel, das in *E. coli* exprimiert und dann aufgereinigt wurde (131). Um zu analysieren, ob die $BadA_{Stiel}$-Domäne an HUVECs bindet, wurden HUVECs mit verschiedenen Konzentrationen des $BadA_{Stiel}$ (10 und 5 µg/ml) inkubiert und 4 h danach eine Proteinextraktion der verwendeten Zellen mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Die $BadA_{Stiel}$-Domäne wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert (**Abb. 14**). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die $BadA_{Stiel}$-Domäne eine konzentrationsabhängige Adhärenz an HUVECs aufweist. Um zu untersuchen, ob das aufgereinigte $BadA_{Stiel}$-Protein eine IL-8- bzw. VEGF-Sekretion induzieren kann, wurden HUVEC- bzw. HeLa-Zellen über 48 h mit $BadA_{Stiel}$ inkubiert und die Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte bei mit $BadA_{Stiel}$ inkubierten HUVECs konzentrationsabhängig eine 1,48 bzw. 1,4-fach höhere Sekretion von IL-8 im Vergleich zu Kontrollzellen und zu Zellen, die mit Proteinase K–inaktiviertem $BadA_{Stiel}$ inkubiert wurden, festgestellt werden. Dagegen ergab sich eine VEGF-Induktion in HeLa-Zellen sowohl bei Inkubation von Zellen mit $BadA_{Stiel}$, als auch bei Zugabe von Proteinase K-inaktiviertem $BadA_{Stiel}$. Diese Induktion der VEGF-Sekretion ist also wahrscheinlich nicht kausal auf das aufgereinigte $BadA_{Stiel}$-Protein zurückzuführen, sondern beruht wahrscheinlich eher auf einem unspezifischen Effekt. Zusammenfassend ließ sich also eine Adhärenz des $BadA_{Stiel}$ an HUVECs nachweisen, ebenso wie eine $BadA_{Stiel}$-getriggerte IL-8 Induktion in HUVECs, nicht dagegen eine durch $BadA_{Stiel}$ ausgelöste VEGF-Induktion in HeLa-Zellen.

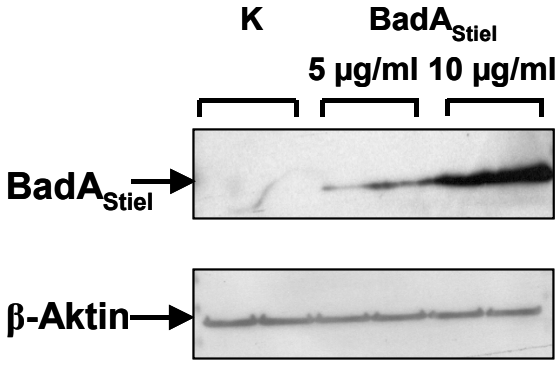


Abb. 14: Adhärenz des $BadA_{Stiel}$. Darstellung der Adhärenz des $BadA_{Stiel}$-Proteins an HUVEC-Zellen. Zur Analyse der Adhärenz des $BadA_{Stiel}$ wurden HUVECs über 4 h nach Zugabe der $BadA_{Stiel}$-Domäne (18 kDa) inkubiert, gewaschen, lysiert und im Western Blot mit einem $BadA_{Stiel}$-spezifischen Antikörper analysiert. Interne Kontrolle: β-Aktin.

3.3 Evaluation des Immunoblots als serodiagnostische Methode zum Nachweis von *Bartonella*-Infektionen

Die Standardmethode zum serologischen Nachweis von Antikörpern bei Infektionen mit *B. henselae* ist seit 1992 der indirekte Immunfluoreszenztest (1,127). Da diese Methode zeitaufwändig ist und das Ergebnis durchaus vom Untersucher abhängt, sollte in dieser Arbeit die Tauglichkeit des Immunoblots als diagnostische Methode zum Nachweis von Anti-BadA-Antikörpern im Patientenserum untersucht werden. Dies wurde anhand von 34 IFT-positiven Patientenseren und 31 IFT-negativen Patientenseren durchgeführt. Die verwendeten 34 IFT-positiven Patientenseren wurden z. T. freundlicherweise von Dr. Anna Sander, Freiburg, zur Verfügung gestellt und wurden im Rahmen dieser Arbeit nochmals im IFT auf IgG-Antikörper gegen *B. henselae* Marseille, Houston-1 und *Bartonella quintana* Toulouse getestet (**Tab. 11**). Die verwendeten IFT-negativen Patientenseren (**Tab. 12)** entstammen der Routinediagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen und wurden parallel im IFT auf IgG-Antikörper gegen *Bartonella spp.* untersucht. In Übereinstimmung mit den Empfehlungen des CDC (1) wurde eine Titerstufe von <1:100 IFT als negativ gewertet, eine Titerstufe >1:100 als positiv bewertet. Titer von 1:100 wurden gemäß CDC-Kriterien als grenzwertig beurteilt, diese Patientenseren wurden bei den Auswertungen in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

3.3.1 Prinzip der Analyse der eingesetzten Patientenseren im BadA-Immunoblot

Um die Tauglichkeit des BadA-Immunoblots als serodiagnostische Methode zu analysieren, wurden Antigen-beschichtete Western Blot Streifen mit Patientenseren inkubiert. Dazu wurden Ganzzelllysate von *B. henselae* Marseille WT, BadA$^-$ und Houston-1 sowie *B. quintana* Toulouse und München auf Western Blot Streifen aufgebracht und mit den im IFT positiv bzw. negativ auf IgG-Antikörper gegen *B. henselae* getesteten Patientseren inkubiert. Nach Inkubation mit einem Sekundärantikörper (IgG) und Detektion der Proteinbanden mit DAB erfolgte die Analyse der Proteinbanden nach ihrer Größe in kDa mit Hilfe einer mitgeführten Proteinleiter (**Abb. 15**). Dabei wurde bei der Auswertung der Antigen-beschichteten Western Blots von *B. henselae* Marseille WT und BadA$^-$ besonderer Augenmerk auf

das bei ~340 kDa detektierbare BadA gerichtet, um es auf eine eventuelle Tauglichkeit als diagnostischer Marker zu untersuchen. Zur Kontrolle der Western Blots wurden vor Testung von Patientenseren Western Blot Streifen mit *B. henselae* (vital)- und BadA-spezifischen Antikörpern sowie mit einem IFT-negativen Patientserum inkubiert (**Abb. 16**). Durch Testung mit dem IFT-negativen Patientenserum wurden unspezifische Effekte vorab ausgeschlossen.

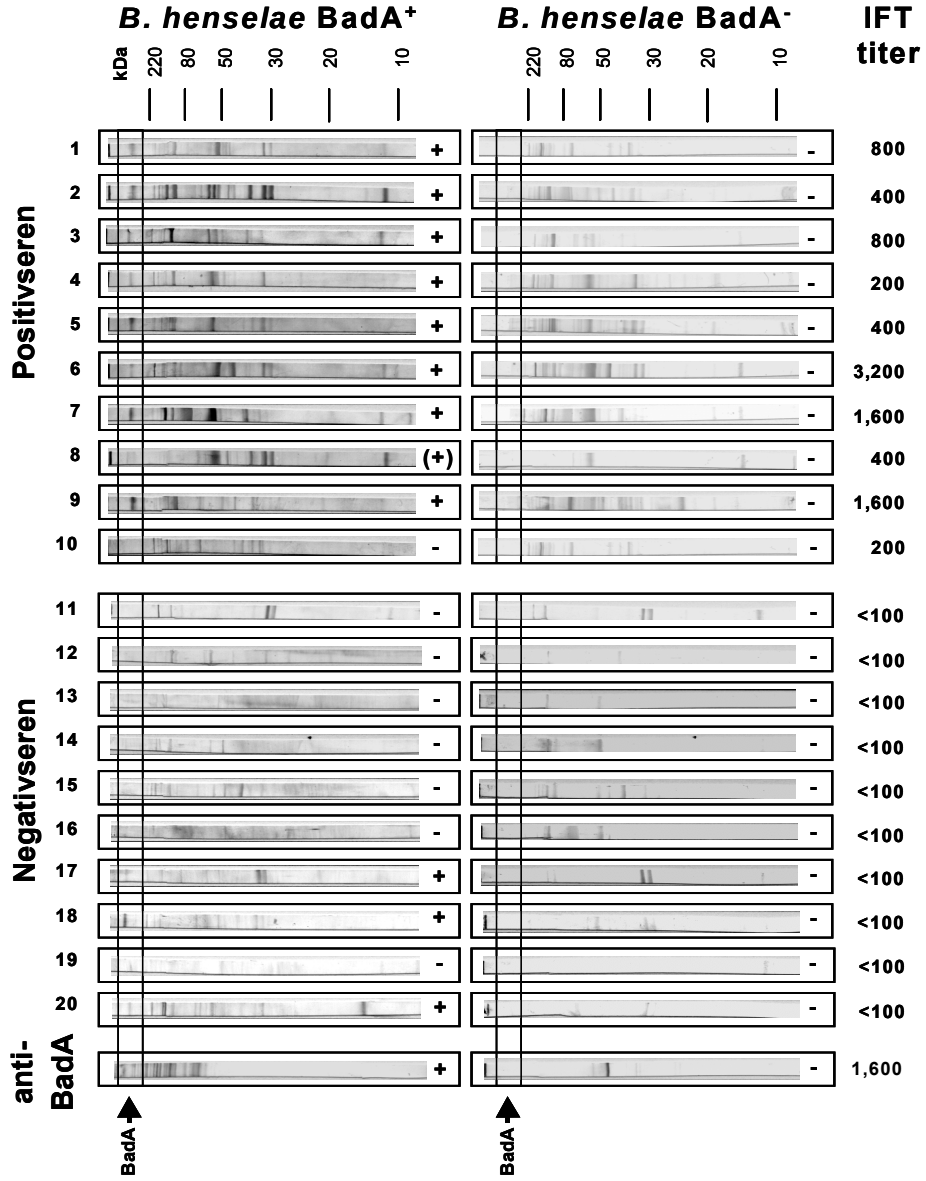


Abb. 15: Beispiel für die Analyse der verwendeten Positiv- und Negativseren im IgG Immunoblot. Im IFT positiv und negativ auf IgG-Antikörper gegen *B. henselae* getestete Patientenseren wurden zu mit Ganzzelllysaten des jeweiligen Bakterienstamms beschichtete Western Blot Streifen gegeben. Nach Inkubation mit Sekundärantikörper (IgG) und Detektion mit DAB wurden die Proteinbanden mit Hilfe einer mitgeführten Proteinleiter analysiert. Nachweisbarkeit der BadA-Proteinbande bei ~340 kDa. Bewertung: Bewertung des BadA-Immunoblots (positiv, negativ). Als interne Kontrolle wurde ein anti-BadA spezifischer Antikörper verwendet.

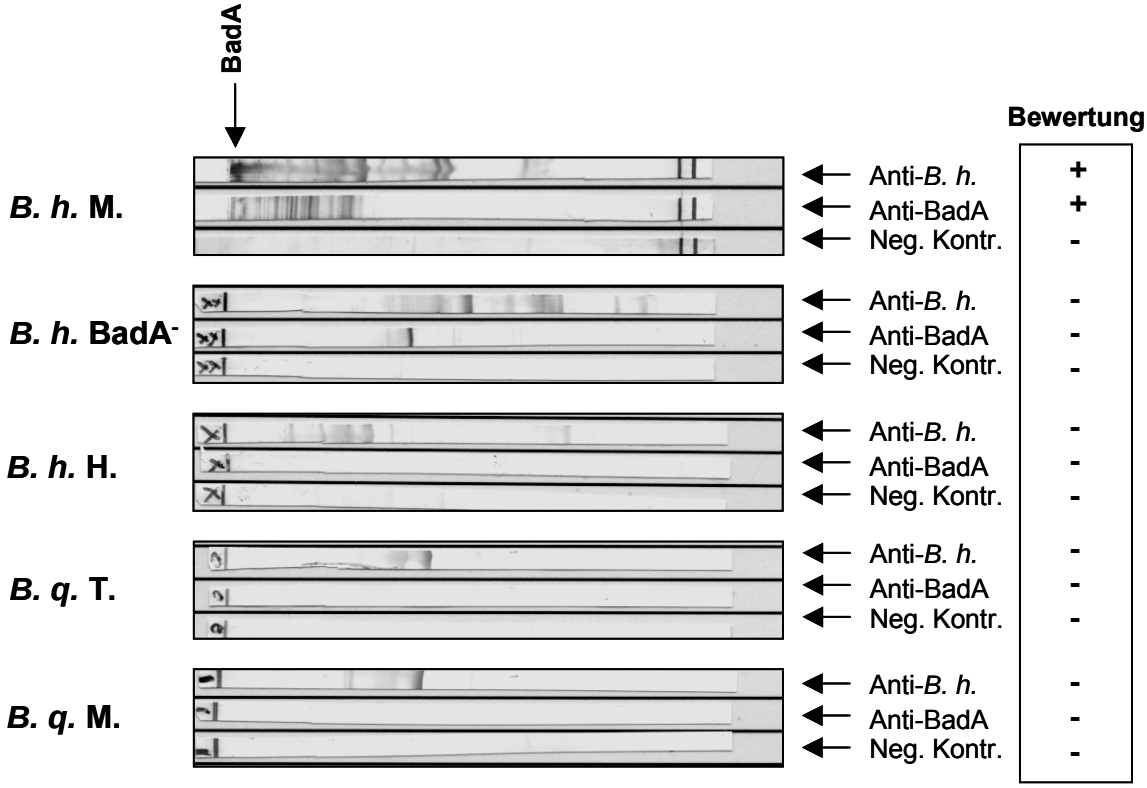


Abb. 16: Kontroll-Western Blots vor der Testung von Patientenseren. Die Western Blots der Bakterienstämme *B. henselae* Marseille WT, BadA$^-$ und Houston-1 und *B. quintana* Toulouse und München wurden mit *B. h.* (vital)- und BadA- spezifischen Antikörpern getestet, um die Auftrennung der Proteine und die Qualität des Western Blots zu prüfen. *B. h*. M.: *B. henselae* Marseille, *B. h.* BadA$^-$: *B. henselae* Marseille BadA$^-$, *B. h.* H. : *B. henselae* Houston-1, *B. q*. T.: *B. quintana* Toulouse, *B. q.* M,: *B. quintana* München, Anti-*B. h.*: Inkubation der Western Blot Streifen mit *B. h.* (vital)-spezifischem Antikörper (Kaninchen, 1:500), anti-BadA: BadA spezifischer Antikörper (Kaninchen, 1:500), Neg. Kontr.: Patientenserum, das negativ im IFT auf Antikörper gegen *B. henselae* getestet wurde. Bewertung: Bewertung des BadA-Immunoblots (positiv, negativ).

Tab. 11: Titerstufen und Nachweisbarkeit von anti-BadA-IgG-Antikörpern in Patientenseren, die zuvor im IFT positiv auf Antikörper gegen *B. henselae* getestet wurden.

Serien Nr.	Serum Nr.	IFT-Titerstufe			BadA im Immunoblot
		B. h. Marseille	*B. h.* Houston-1	*B. q.* Toulouse	
1	Sa 2	200	100	100	pos.
2	Sa 5	800	800	800	neg.
3	Sa 6	400	400	400	neg.
4	Sa 7	400	400	400	neg.
5	Sa 8	3200	800	400	neg.
6	Sa 9	400	400	200	pos.
7	Sa 10	400	200	800	neg.
8	Sa 13	800	800	800	pos.
9	Sa 14	200	100	100	pos.
10	Sa 16	1600	1600	1600	neg.
11	Sa 19	400	100	200	pos.

Serien Nr.	Serum Nr.	IFT-Titerstufe			BadA im Immunoblot
		B. h. Marseille	*B. h.* Houston-1	*B. q.* Toulouse	
12	Sa 21	200	100	100	pos.
13	Sa 22	400	400	200	pos.
14	Sa 23	400	200	200	pos.
15	Sa 28	800	800	800	neg.
16	Sa 30	200	100	100	pos.
17	Sa 31	400	400	400	pos.
18	Sa 32	3200	1600	3200	pos.
19	Sa 33	800	200	400	pos.
20	Sa 37	1600	1600	800	pos.
21	Sa 38	400	100	200	neg.
22	Sa 40	400	400	400	pos.
23	Sa 43	200	100	100	pos.
24	Sa 44	200	100	100	neg.
25	Sa 45	200	400	200	pos.
26	Sa 46	1600	800	200	pos.
27	Sa 47	800	1600	800	pos.
28	Sa 48	800	400	200	pos.
29	Sa 50	200	100	100	pos.
30	Se 3822	400	200	200	pos.
31	Se 4288	800	400	400	pos.
32	Se 1113/04	400	200	200	pos.
33	Se 1146/04	800	800	800	pos.
34	Se 2467/04	400	200	200	pos.

Tab. 12: Titerstufen und Nachweisbarkeit von anti-BadA-IgG-Antikörpern in Patientenseren, die zuvor im IFT negativ auf Antikörper gegen *B. henselae* getestet wurden.

Serien Nr.	Serum Nr.	IFT-Titerstufe			BadA im Immunoblot
		B. h. Marseille	*B. h.* Houston-1	*B. q.* Toulouse	
1	Se 5808/04	<100	<100	<100	neg.
2	Se 6181/04	<100	<100	<100	pos.
3	Se 6350/04	<100	<100	<100	neg.
4	Se 6471/04	<100	<100	<100	neg.
5	Se 6711/04	<100	<100	<100	pos.
6	Se 7324/04	<100	<100	<100	neg.
7	Se 7424/04	<100	<100	<100	neg.
8	Se 7652/04	<100	<100	<100	neg.
9	Se 7688/04	<100	<100	<100	neg.
10	Se 7902/04	<100	<100	<100	pos.
11	Se 8060/04	<100	<100	<100	pos.
12	Se 8290/04	<100	<100	<100	neg.
13	Se 8556/04	<100	<100	<100	pos.
14	Se 8634/04	<100	<100	100	neg.
15	Se 8803/04	<100	<100	<100	neg.

Serien Nr.	Serum Nr.	IFT-Titerstufe			BadA im Immunoblot
		B. h. Marseille	*B. h.* Houston-1	*B. q.* Toulouse	
16	Se 9105/05	<100	<100	<100	neg.
17	Se 9136/04	<100	<100	<100	pos.
18	Se 9224/04	<100	<100	<100	neg.
19	Se 9383/04	<100	<100	<100	neg.
20	Se 9384/04	<100	<100	<100	neg.
21	Se 9452/04	<100	<100	<100	neg.
22	Se 9875/04	<100	<100	<100	neg.
23	Se 10039/04	<100	<100	<100	neg.
24	Se 10081/04	<100	<100	<100	neg.
25	Se 10491/04	<100	<100	<100	neg.
26	Se 6973/04	<100	<100	<100	neg.
27	Se 7043	<100	<100	<100	neg.
28	Se 7295	<100	<100	<100	neg.
29	Se 7359	100	<100	100	pos.
30	Se 7527	<100	<100	<100	pos.
31	Se 7772	<100	<100	<100	neg.

3.3.2 Analyse der Nachweisbarkeit von anti-BadA-Antikörpern im Immunoblot

Um die Tauglichkeit von BadA als serodiagnostischer Marker zu testen, wurde die Nachweisbarkeit von anti-BadA-Antikörpern in IFT-positiven und –negativen Patientenseren im Immunoblot bestimmt. Hierfür wurden Antigen-beschichtete Western Blot Streifen von *B. henselae* Marseille WT verwendet, mit Patientenseren und einem geeigneten Anti-IgG Sekundärantikörper inkubiert und nach Detektion mit DAB die Nachweisbarkeit von anti-BadA-Antikörpern bestimmt. Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse wurde das Auftreten von anti-BadA-Antikörpern außerdem in Abhängigkeit von der jeweiligen IFT-Titerstufe dargestellt (**Abb. 17**). Die Nachweisbarkeit von anti-BadA-Antikörpern im Immunblot erwies sich bei den IFT-positiv getesteten Patientenseren als weitgehend unabhängig von der Titerstufe. Insgesamt gestaltet sich die Differenzierung der Banden schwierig, da eine Vielzahl von Banden, die eng beieinander liegen, vorhanden waren.

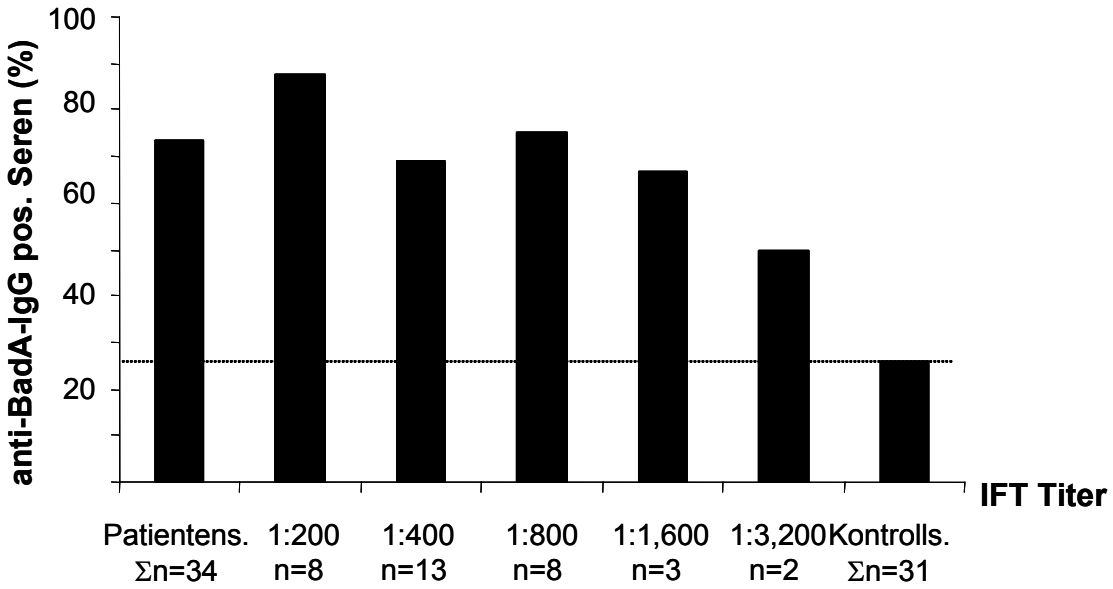


Abb. 17: Evaluation von anti-BadA-IgG im Immunoblot. Die Häufigkeit von anti-BadA-IgG in Patientenseren und Kontrollseren wurde in Abhängigkeit von der Titerstufe im IFT analysiert. Hierfür wurden Ganzzelllysate von *B. henselae* Marseille WT auf Western Blot Streifen aufgebracht und mit Patienten- und Kontrollseren inkubiert. Nach Inkubation mit einem Sekundärantikörper erfolgte die Detektion mit DAB und die Analyse auf das Vorhandensein von BadA (~340 kDa). Patientens.: im IFT mit einem Titer von >1:100 auf Antikörper gegen *B. henselae* Marseille getestete Patientenseren, Kontrolls.: im IFT mit einem Titer von <1:100 auf Antikörper gegen *B. henselae* Marseille getestete Seren gesunder Blutspender. Die Anzahl der jeweils verwendeten Patientenseren ist mit n=x angegeben.

Mit Hilfe einer Vierfeldertafel konnte der Immunoblot und damit die Nachweisbarkeit von anti-BadA-Antiköpern mit der Standardmethode des IFT verglichen und die diagnostische Sensitivität und Spezifität, sowie der positive und negative Vorhersagewert bestimmt werden (**Tab. 13**). Die diagnostische Sensitivität gibt dabei an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Labortest, in diesem Fall der Immunoblot, in einer Gruppe von mit einem Standardtest positiv getesteten Kranken ein auffälliges Testergebnis ergibt. Die diagnostische Spezifität definiert hingegen, mit welcher Wahrscheinlichkeit in einer Gruppe Gesunder ein unauffälliges Testergebnis gefunden wird. Der positive Vorhersagewert beschreibt, wie viele mit einem Labortest (in diesem Fall dem Immunoblot) positiv getestete Probanden auch tatsächlich anti-*B. henselae*-Antikörper, also in einem Standardtest ein positives Testergebnis aufweisen. Der negative Vorhersagewert gibt hingegegen an, wie viele der Immunblot negativ-getesteten Probanden auch tatsächlich keine anti-*B. henselae*-Antikörper, also auch im Standardtest einen negativen Befund aufweisen.

$$\text{Diagnostische Sensitivität} = \frac{\text{richtig positiv}}{\text{richtig positiv + falsch negativ}}$$

$$\text{Diagnostische Spezifität} = \frac{\text{richtig negativ}}{\text{richtig negativ + falsch positiv}}$$

$$\text{Positiver Vorhersagewert} = \frac{\text{richtig positiv}}{\text{richtig positiv + falsch positiv}}$$

$$\text{Negativer Vorhersagewert} = \frac{\text{richtig negativ}}{\text{richtig negativ + falsch negativ}}$$

Tab. 13: Vierfeldertafel zur Analyse der Sensitivität und Spezifität des Immunoblots im Vergleich zu der Standardmethode IFT

	IFT-positiv	**IFT-negativ**	
Immunoblot-positiv	richtig positiv	falsch positiv	**Summe Immunoblot-positiv**
Immunoblot-negativ	falsch negativ	richtig negativ	**Summe Immunoblot-negativ**
	Summe IFT-positiv	**Summe IFT-negativ**	

	IFT-positiv	**IFT-negativ**	
Immunoblot-positiv	25	8	33
Immunoblot-negativ	9	23	32
	34	31	

Zusammenfassend weist der Immunoblot mit BadA als diagnostischem Marker im Vergleich mit der Standardmethode IFT eine Sensitivität von 73,5 % und eine Spezifität von 74,2 % auf. Der positive Vorhersagewert beträgt 75,8 %, der negative

Vorhersagewert 71,9 %. Die Nachweisbarkeit von BadA-Antikörpern in IFT-positiven Patientseren ist dabei weitgehend unabhängig von der IFT-Titerstufe.

3.3.3 Analyse weiterer Proteinbanden auf ihre Tauglichkeit als diagnostischer Marker im Immunoblot

Um zu analysieren, ob sich neben BadA (3.3.2) andere, im Western Blot detektierbare Banden als Marker für die Diagnostik von *Bartonella*-Infektionen eignet,

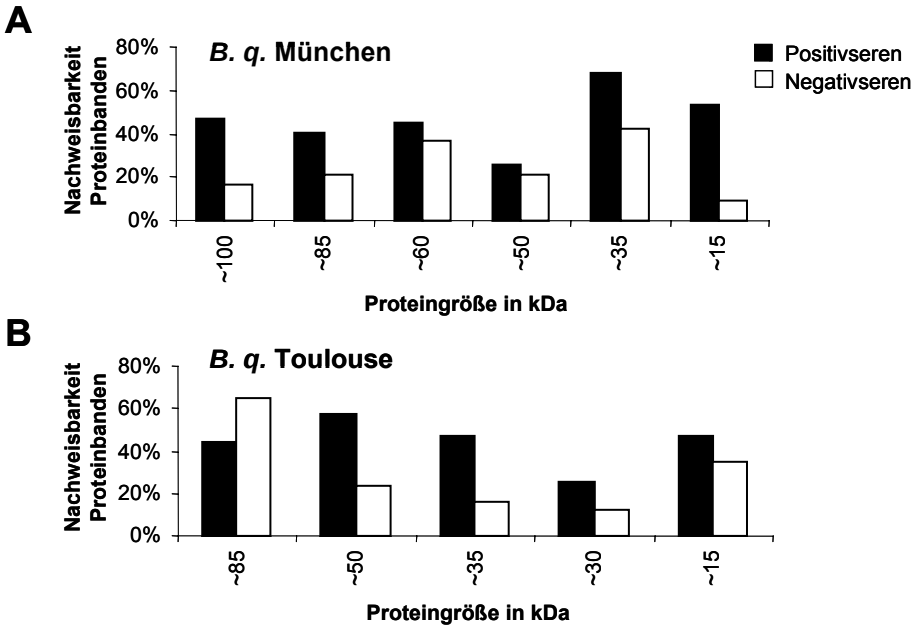


Abb. 18: Nachweisbarkeit von Proteinbanden im Immunoblot nach Inkubation mit Patientenseren. Western Blot Streifen mit Ganzzelllysaten von *B. quintana* Toulouse (**A**) und München (**B**) wurden mit im IFT positiv und negativ getesteten Patientenseren inkubiert. Die Analyse und Darstellung der Proteinbanden erfolgte nach der ungefähren Proteingröße in kDa, die mit Hilfe einer Proteinleiter abgeschätzt wurde. Antikörper gegen Proteine, die größer waren als 100 kDa bei *B. quintana* München bzw. als 85 kDa bei *B. quintana* Toulouse, konnten in diesen Immunoblots nicht nachgewiesen werden. Darstellung der prozentualen Nachweisbarkeit der einzelnen Proteinbanden. Positivseren: im IFT positiv auf Antikörper gegen *B. henselae* getestete Patientenseren, Negativseren: im IFT negativ auf Antikörper gegen *B. henselae* getestete Patientenseren

wurden sämtliche nach Inkubation mit IFT-positven und -negativen Patientenseren sichtbaren Proteinbanden der untersuchten Bakterienstämme *B. henselae* Marseille WT, BadA$^-$, Houston-1 sowie *B. quintana* Toulouse und München analysiert und nach ihrer Größe und prozentualen Nachweisbarkeit dargestellt (**Abb. 19, Abb. 18**).

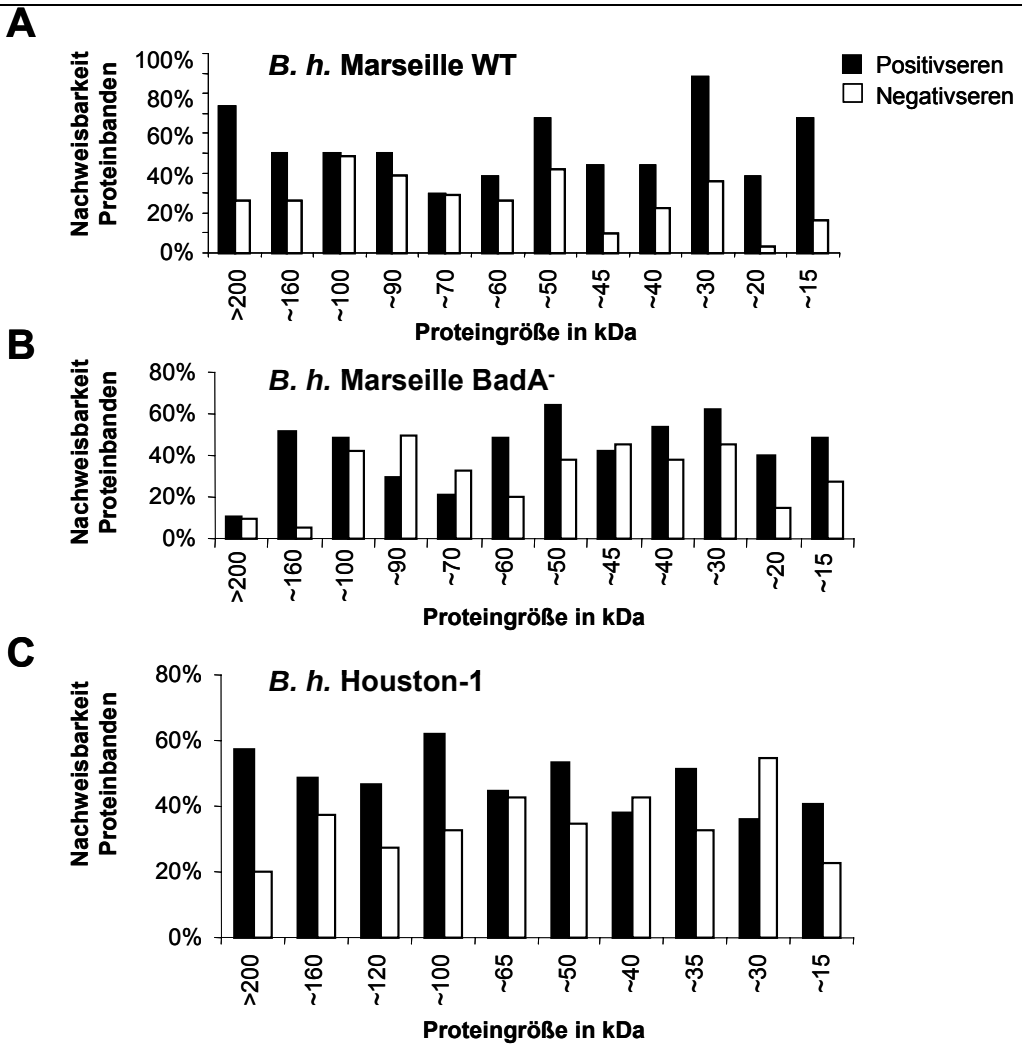


Abb. 19: Nachweisbarkeit von Antikörpern gegen Proteinbanden im Immunoblot nach Inkubation mit Patientenseren. Western Blot Streifen mit Ganzzelllysaten von *B. henselae* Marseille WT (A), BadA$^-$ (B) und *B. henselae* Houston-1 (C) wurden mit im IFT positiv und negativ getesteten Patientenseren inkubiert. Die Analyse und Darstellung der Antiköper gegen Proteinbanden erfolgte nach der ungefähren Proteingröße in kDa, die mit Hilfe einer Proteinleiter abgeschätzt wurde. Dabei traten bei den verschiedenen Bakterienstämmen Antikörper gegen Proteine unterschiedlicher Größe auf. Darstellung der prozentualen Nachweisbarkeit der einzelnen Proteinbanden. Positivseren: im IFT positiv auf Antikörper gegen *B. henselae* getestete Patientenseren, Negativseren: im IFT negativ auf Antikörper gegen *B. henselae* getestete Patientenseren.

Dabei konnte festgestellt werden, dass BadA die größte Bedeutung als diagnostischer Marker zukommt, da es mit keinem anderen Protein möglich ist, IFT-positive von IFT-negativen Patientenseren zu differenzieren. Allenfalls im niedermolekularen Bereich zwischen ~15 und ~20 kDa bei *B. henselae* Marseille WT und dem ~15 kDa von *B. quintana* München können Proteinbanden definiert werden, die eine Entscheidung zwischen IFT-positiv und IFT-negativ zulassen und als Bestätigung der IFT-Ergebnisse im Sinne einer Zweistufendiagnostik dienen können.

3.3.4 Analyse der Kreuzreaktivität von *Yersinia*-Antikörpern mit BadA

Um zu analysieren, ob wegen der strukturellen Homologien von YadA und BadA (131) eine Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern gegen *Yersinia* spp. und *Bartonella* besteht, wurden zehn ausgewählte, im ELISA und Immunoblot positiv auf IgG-Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica* getestete Patientenseren (bei zwei der Patientenseren fand sich außerdem ein positiver Befund im WIDAL gegen *Yersinia* pseudotuberculosis) im Immunoblot auf eine Reaktivität gegen BadA getestet (**Tab. 15**).

Zusätzlich wurden sämtliche nach Inkubation mit Patientenseren detektierbare Banden analysiert. Außerdem wurden die eingesetzten Patientenseren mittels IFT auf Reaktivität mit *B. henselae* untersucht (**Tab. 14**). Dabei konnte in zwei von zehn Patientenseren eindeutig Antikörper gegen *B. henselae* und *B. quintana* nachgewiesen werden, in einem Serum wurden Antikörper lediglich gegen *B. henselae* Marseille nachgewiesen. Im Immunoblot wurden hingegen in keinem der eingesetzten Patientenseren Antikörper gegen BadA nachgewiesen (**Abb. 20**). Damit konnte im Immunoblot gezeigt werden, dass höchstwahrscheinlich keine Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern gegen YadA und BadA besteht.

Tab. 14: Titerstufen und Nachweisbarkeit von Anti-BadA-IgG-Antikörpern in Patientenseren, die zuvor positiv auf Antikörper gegen *Yersinia spp.* getestet wurden.

Serien Nr.	Serum Nr.	IFT-Titerstufe			BadA im Immunoblot	
		B. h. **Marseille**	***B. h.*** **Houston-1**	***B. q.*** **Toulouse**	***B. h.*** **Marseille WT**	***B. h.*** **Marseille BadA$^-$**
1	Se 3008/04	100	100	100	neg.	neg.
2	Se 3010/04	200	<100	<100	neg.	neg.
3	Se 3047/04	200	100	400	neg.	neg.
4	Se 3049/04	<100	<100	<100	neg.	neg.
5	Se 3974/04	<100	<100	<100	neg.	neg.
6	Se 4995/04	1600	800	400	neg.	neg.
7	Se 5017/04	<100	<100	<100	neg.	neg.
8	Se 5204/04	<100	<100	<100	neg.	neg.
9	Se 5205/04	<100	<100	<100	neg.	neg.
10	Se 8814/04	<100	<100	<100	neg	neg

Tab. 15: Serologische Parameter der verwendeten *Yersinia* spp. Patientenseren. Die Analyse erfolgte mittels WIDAL, ELISA und Immunoblot. Angegeben sind die jeweiligen Titerstufen im WIDAL, die Messergebnisse (in U/ml) im ELISA und die Bewertung im Immunoblot. *Y. e.: Yersinia enterocolitica, Y. p.: Yersinia pseudotuberculosis*, n. d.: nicht durchgeführt.

Serien Nr.	Serum-Nr.	WIDAL-Titerstufe			ELSIA (U/ml)		Immunoblot	
		Y. e. O3	*Y. e.* O9	*Y. p.* Typ I	*Y. e* IgG	*Y. e* IgA	*Y. e* IgG	*Y. e* IgA
1	Se 3008/04	<100	<100	<100	74	n. d.	pos.	neg.
2	Se 3010/04	<100	<100	<100	205	n. d.	pos.	pos.
3	Se 3047/04	<100	<100	<100	281	n. d.	pos.	pos.
4	Se 3049/04	<100	<100	<100	113	n. d.	pos.	pos.
5	Se 3974/04	1600	<100	<100	397	n. d.	pos.	pos.
6	Se 4995/04	<100	<100	200	233	n. d.	pos.	pos.
7	Se 5017/04	<100	<100	200	233	n. d.	pos.	pos.
8	Se 5204/04	<100	<100	<100	462	n. d.	pos.	pos.
9	Se 5205/04	Die Daten konnten wegen computertechnischer Probleme nicht mehr aufgefunden werden.						
10	Se 8814/04							

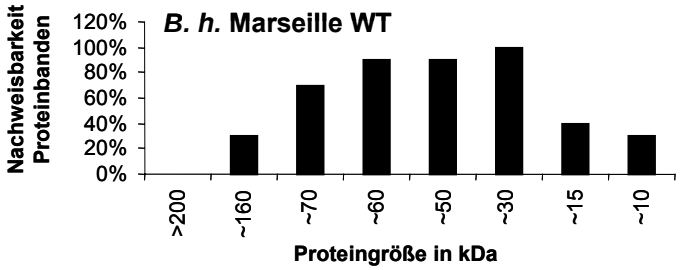


Abb. 20: Testung von im IFT auf Antikörper gegen *Yersinia spp.* getestete Patientenseren im Immunoblot gegen *B. henselae* Marseille. Zehn ausgewählte, vorab positiv auf Antikörper gegen *Yersinia spp*. getestete Patientenseren wurden im Immunoblot auf Kreuzreaktivität gegen *B. henselae* Marseille WT untersucht. Die Analyse der prozentualen Nachweisbarkeit der Proteinbanden erfolgte in Abhängigkeit von der ungefähren Proteingröße in kDa, die mit Hilfe einer Proteinleiter ungefähr bestimmt wurde. Besonderes Augenmerk wurde auf eine Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern gegen YadA und BadA gerichtet.

3.3.5 Analyse der $BadA_{Kopf}$-Domäne auf ihre Tauglichkeit als diagnostischer Marker

Wie zuvor gezeigt wurde, gestaltet sich die Verwendung von BadA als diagnostischer Marker schwierig, da im Ganzzelllysat der Bakterien eine Vielzahl verschiedener Proteinbanden differenziert werden muss. Außerdem gestaltet es sich wegen der Größe von BadA (~340 kDa) schwierig, dieses Protein sicher im Western Blot nachweisen zu können. Deshalb erschien es sinnvoll, die $BadA_{Kopf}$-Domäne (AS 48-376) auf ihre Tauglichkeit als Marker im Immunoblot zu überprüfen. Das in *E. coli* exprimierte und aus den entstandenen Einschlusskörperchen aufgereinigte Protein (Dr. Tanja Rieß, Dr. Dirk Linke, nicht publiziert) wurde auf Western Blot Streifen

aufgebracht und mit ausgewählten im IFT positiv und negativ auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen *B. henselae* getesteten Patientenseren in verschiedenen Verdünnungen (2 x 10^{-2}, 2 x 10^{-3}, 2 x 10^{-4}) inkubiert. Von den jeweils vier getesteten Patientenseren waren bei der geringsten Verdünnung in allen vier der IFT-positiven Seren, dagegen in zwei der IFT-negativen Seren Antikörper gegen $BadA_{Kopf}$ nachweisbar. Bei einer Verdünnung von 1:2000 waren Antikörper gegen den $BadA_{Kopf}$ noch bei zwei der IFT-positiven und bei keinem der IFT-negativen Patientseren nachweisbar. Bei der höchsten eingesetzten Verdünnung waren keine Antikörper gegen das $BadA_{Kopf}$-Protein mehr zu detektieren (**Abb. 21**). Obwohl es sich hierbei um keine repräsentative Stichprobe handelt, scheint der $BadA_{Kopf}$ insgesamt kein hinreichend spezifischer diagnostischer Marker zu sein, da zwar alle IFT-positiven Seren im Immunoblot auch als positiv erkannt wurden, jedoch auch die Hälfte der IFT-negativen Seren im Immunoblot Antikörper gegen das $BadA_{Kopf}$-Protein aufzuweisen scheinen.

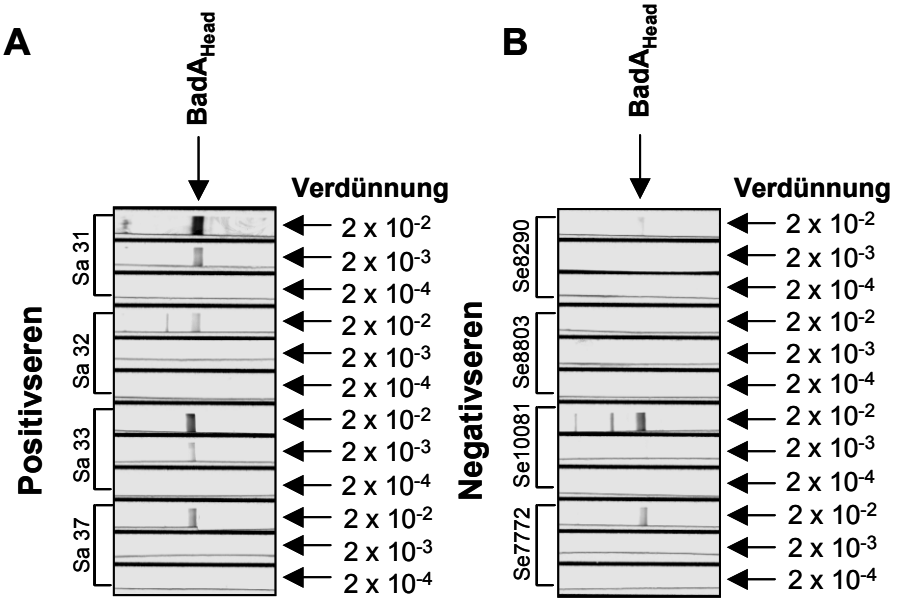


Abb. 21: Analyse der $BadA_{Head}$-Domäne auf ihre Tauglichkeit als diagnostischer Marker. Western Blots mit aufgereinigtem $BadA_{Head}$-Protein (42 kDa) wurden mit im IFT positiv und negativ auf Antikörper gegen *B. henselae* getesteten Patientenseren (seriell verdünnt: 2 x 10^{-2}, 2 x 10^{-3}, 2 x 10^{-4}) inkubiert. Nach Inkubation mit Sekundärantikörper erfolgte die Detektion mit DAB-Entwicklungslösung und die Analyse der Banden. Positivseren: im IFT positiv auf Antikörper gegen *B. henselae* getestete Patientenseren, Negativseren: im IFT negativ auf Antikörper gegen *B. henselae* getestete Patientenseren. Von den jeweils vier getesteten Patientenseren waren in allen vier der IFT-positiven Seren, dagegen in zwei der IFT-negativen Seren Antikörper gegen $BadA_{Head}$ nachweisbar.

4 Diskussion

Die Fähigkeit, vaskuloproliferative Krankheitsbilder auszulösen, ist eine einzigartige Eigenschaft von *Bartonella* spp. *In vitro* sind *Bartonella* spp. in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Wirtszellen zu infizieren: so wurde für *B. henselae* die Infektion von Endothel- (46,85,131) und Epithelzellen (13,86), von Monozyten bzw. Makrophagen (84,116,128) sowie kürzlich von hämatopoeischen Vorläuferzellen (106) nachgewiesen. *B. quintana* ist ebenfalls in der Lage, Endothel- und Epithelzellen zu infizieren (13,20).

Die eigentlichen Zielzellen einer *B. henselae* Infektion stellen jedoch wahrscheinlich Endothelzellen dar. Es ist anzunehmen, dass sich der Erreger (*B. henselae*) sein eigenes Habitat (Endothelzelle) durch Induktion der Endothelproliferation über direkte Stimulation der Endothelzellproliferation, Inhibition der Endothelzellapoptose und Auslösung einer parakrinen, proangiogenetischen Wirtszellantwort sichert (82), was in einem vaskuloproliferativen Krankheitsgeschehen resultiert. Diese Fähigkeit von *B. henselae* kann als eine neuartige Pathogenitätsstrategie („paracrine-loop"-Modell) angesehen werden. Demzufolge verursacht der Erreger (*Bartonella* spp.) über die Induktion der Sekretion von Wachstumsfaktoren (VEGF u. a.) aus infizierten Zellen (Epithelzellen, Makrophagen) nachfolgend die Proliferation der Zielzellen (Endothelzellen) einer *B. henselae*-Infektion, ein Mechanismus, wie er analog für das Pflanzenpathogen *A. tumefaciens* beschrieben wurde [**Abb. 22**, (82)].

Die herausragende Bedeutung des trimeren Autotransporter-Adhäsins BadA von *B. henselae* im Infektionsverlauf und bei der Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort ist kürzlich beschrieben worden (131). Welche Rolle BadA bei der Infektion von Endothelzellen durch *B. henselae* zukommt, welche Funktion einzelne BadA-Domänen dabei innehaben und welche anderen Pathogenitätsfaktoren im Infektionsverlauf von Bedeutung sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

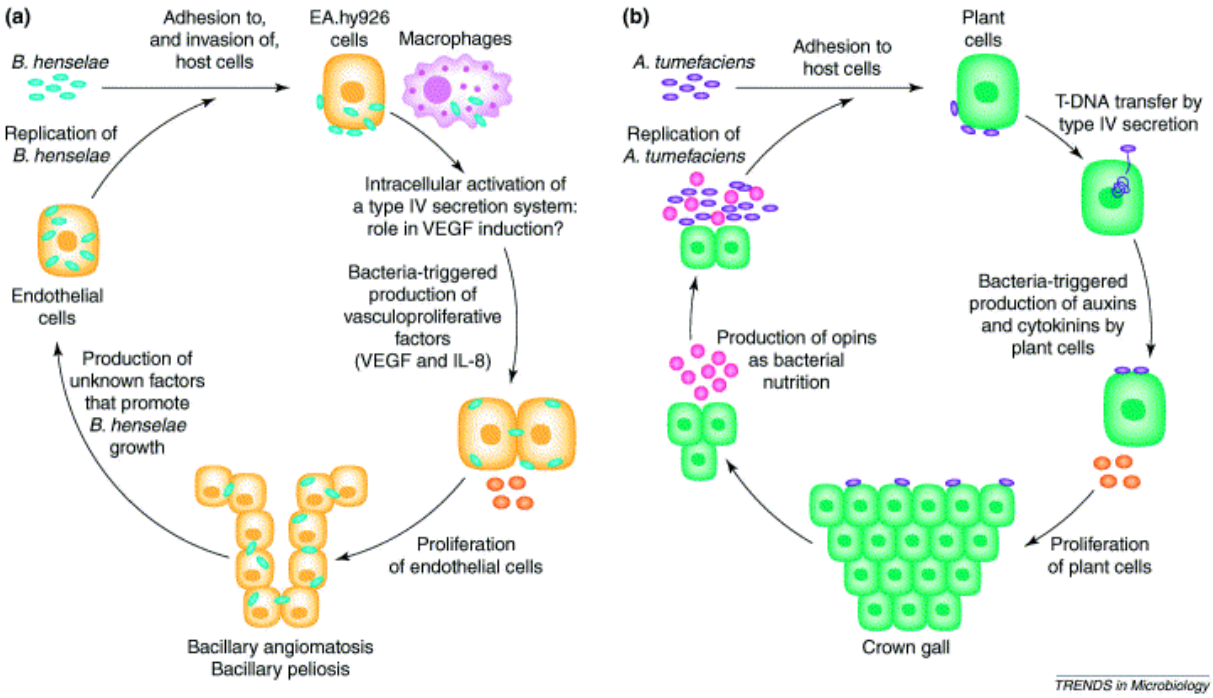


Abb. 22: **(a)** Das „paracrine loop-Modell“ der Induktion von Vaskuloproliferationen durch *B. henselae* sowie **(b)** das „Opin-Konzept“ von *A. tumefaciens*. Schematische Darstellung der analogen Schritte der Pathogenitätsmechanismen der beiden Erreger. Nach Infektion der Wirtszellen verursachen beide Pathogene die Produktion von Wachstumsfaktoren (*B. henselae*: VEGF und andere; *A. tumefaciens*: Auxine und Zytokinine). Diese Wachstumsfaktoren führen zur Proliferation von Wirtszellen (*B. henselae*: Endothelzellen; *A. tumefaciens*: Pflanzenzellen). Die daraus resultierende tumoröse Wucherung wird im Falle von *B. henselae* als „Bazilläre Angiomatose“, im Falle von *A. tumefaciens* als „Wurzelhalsgalle“ bezeichnet. Im Endeffekt bieten beide stark vaskularisierten Tumore gute bakterielle Wachstumsbedingungen, indem sie die jeweiligen Pathogene mit Nährstoffen supplementieren. Im Falle der Wurzelhalsgalle werden diese Nährstoffe (Opine) von *A. tumefaciens* verstoffwechselt. Die Substrate, die das Wachstum von *B. henselae* in Endothelzellen bedingen, sind bislang nicht bekannt, dürften jedoch mit der Proteinbiosynthese der Wirtszellen in unmittelbarem Zusammenhang stehen. Entnommen aus (82)

4.1 Aktivierung einer proangiogenetischen und proinflammatorischen Wirtszellantwort in ECs nach Infektion mit *B. henselae*

4.1.1 Analyse der BadA-Abhängigkeit der Endothelzellantwort

Wegen der großen Bedeutung von Endothelzellen im Verlauf einer Infektion mit *B. henselae* (82) wurde das Genexpressionsmuster in HUVECs nach Infektion mit *B. henselae* im Vergleich zu nicht infizierten Zellen analysiert mittels Gen-Chip-Experimenten (95) (**Tab. 17**, **Abb. 24**). Dabei konnte gezeigt werden, dass eine *B. henselae*-Infektion in HUVECs außer einer proangiogenetischen auch eine inflammatorische Wirtszellantwort zur Folge hat. Außerdem konnte die Aktivierung einiger Gene detektiert werden, die bekanntermaßen in der Karzinogenese eine Rolle spielen. Das Genexpressionsmuster in HUVECs nach Infektion mit *B. henselae* konnte für einige HIF-1-regulierte [VEGF, Adrenomedullin (ADM), HK2] und für einige NF-κB-regulierte Gene (MCP-1, GM-CSF) auf mRNA- sowie zum Teil auch auf Proteinebene verifiziert werden (83).

Dagegen ergaben Gen-Chip-Experimente in *B. henselae*-infizierten HeLa-Zellen eine Aktivierung proangiogenetischer Gene und abgesehen von IL-8, das sowohl eine angiogenetische wie auch inflammatorische Rolle spielt, keine Induktion von inflammatorischen Genen (83). In HeLa-Zellen wird bekanntlich kein TLR-4 exprimiert (124). Trotzdem konnte auch in HeLa-Zellen eine NF-κB-Aktivierung nach *B. henseleae*-Infektion gezeigt werden (83). Die NF-κB-abhängige IL-8-Induktion konnte mit Hilfe des NF-κB-Inhibitors Parthenolid bestätigt werden, der eine IL-8 Aktivierung verhinderte, jedoch keinen Einfluss auf eine VEGF-Sekretion hatte (83). Damit konnte gezeigt werden, dass IL-8 trotz seiner Bedeutung für proangiogenetische und inflammatorische Vorgänge klar NF-κB-abhängig reguliert wird.

In dieser Arbeit sollte nun die Rolle von BadA für die Auslösung angiogenetischer und inflammatorischer Vorgänge im Infektionsverlauf analysiert werden. Dazu wurden HUVECs mit *B. henselae* WT und BadA$^-$ infiziert und die Geninduktion ausgewählter proangiogenetischer und proinflammatorischer Gene auf mRNA-Ebene analysiert. Es konnte eine klare BadA-Abhängigkeit der Induktion einer

proangiogenetischen Wirtszellantwort in HUVECs festgestellt werden (**Abb. 6**). Dies stimmt mit den im HeLa-Zellkulturmodell erhobenen Daten überein, wonach HIF-1 und die HIF-1 regulierten Gene VEGF, ADM und IGFBP-3 in Abhängigkeit von der BadA-Expression von *B. henselae* aktiviert werden (131).

VEGF ist das stärkste Hypoxie-induzierbare Mitogen für Endothelzellen (97). Es ist bekannt, dass der VEGF-Rezeptor KDR, der HIF-2-reguliert ist (76), in Endothelzellen nach *B. henselae*-Infektion induziert wird (83). Diese Beobachtung lässt sich als eine Erweiterung des „paracrine loop"–Modells verstehen [**Abb. 22**, (82)] und könnte bedeuten, dass das von Endothel- und Epithelzellen sekretierte VEGF über die vermehrte Induktion des VEGF-Rezeptors KDR verstärkt auf die Endothelzellen zurückwirkt. Diese Überlegung wird durch *in vivo* Daten gestützt, die in Endothelzellen eine Expression der VEGF-Rezeptoren FLT-1 (*fms-related tyrosine kinase*-1) und KDR nach *B. bacilliformis*-Infektion beschreiben (31).

Außerdem wurde die BadA-Abhängigkeit der Aktivierung NF-κB-regulierter Gene auf mRNA-Ebene untersucht. Die Aktivierung der untersuchten (NF-κB-regulierten) Gene (MCP-1, ICAM-1, IL-8) kann BadA-unabhängig erfolgen, wenngleich gezeigt werden konnte, dass mit *B. henselae* WT infizierte Endothelzellen eine signifikant stärkere Induktion der Proteinsekretion aufwiesen als Endothelzellen, die mit der BadA-defizienten Transposonmutante infiziert wurden.

BadA könnte für die Adhärenz an die jeweilige Wirtszelle, wie sie für viele TAAs beschrieben wurde (71), eine wesentliche Rolle spielen. Die BadA-abhängige Adhärenz wurde in dieser Arbeit an Endothelzellen mittels CLSM untersucht. Dabei zeigte sich eine deutlich stärkere Adhärenz und Invasion des WT gegenüber dem BadA-defizienten Bakterienstamm, in Übereinstimmung mit Vorexperimenten unseres Labors (131). Es wird vermutet, dass es sich um eine Bindung von BadA an β1-Integrine, wie sie in Endothel- und Epithelzellen exprimiert werden, handelt, die Fn-vermittelt stattfindet (131).

Bemerkenswert bei der Analyse der proinflammatorischen Wirtszellanwort ist, dass IL-8 auf mRNA-Ebene von *B. henselae* BadA$^-$ nur geringfügig induziert wurde, während 48 h nach Infektion eine ähnlich starke Induktion der Proteinsekretion von

IL-8 wie nach Infektion mit dem WT detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass die IL-8 Produktion der Wirtszelle posttranskriptionell reguliert wird, indem die IL-8-mRNA durch phosphorylierte p38 MAPK (pp38) stabilisiert wird (64,72). Außerdem wird pp38 in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae* aktiviert, wenngleich ihr keine Rolle in der posttranskriptionellen Regulation von VEGF zukommt (83).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die pp38 in HUVECs BadA-abhängig aktiviert wird (**Abb. 7**). Welche genaue Funktion BadA bei dieser Aktivierung erfüllt, kann nicht abschließend geklärt werden. Jedoch könnte angenommen werden, dass die IL-8-mRNA in Endothelzellen nach Infektion mit *B. hensleae* BadA$^-$ posttranskriptionell nicht durch die pp38 stabilisiert wird, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, deshalb die mRNA weniger stabil ist und folglich nach 6 h weniger deutlich detektiert werden kann.

4.1.2 Bedeutung von *B. henselae* OMPs im Infektionsverlauf

Mindestens fünf *outer membrane proteins* (OMPs) von *B. henselae* binden an Endothelzellen. Beschrieben wurde dieses Verhalten für das 28, 32, 43, 52 und 58 kDa OMP (22). Besonders für ein 43 kDa OMP, das eine dem OMP 2b von *Brucella* spp. ähnliche Aminosäuresequenz aufweist, konnte eine Bindungsfähigkeit an HUVECs nachgewiesen werden (23). Angereinigte OMPs von *B. henselae* stimulieren die Transkription der NF-κB-regulierten Gene ICAM-1 und E-Selektin konzentrationsabhängig. Dabei erwiesen sich die *B. henselae*-OMPs in der NF-κB-Aktivierung als ähnlich kompetent wie TNF-α. Dass es sich bei dieser NF-κB-Aktivierung um einen LPS-Effekt handelt, konnte durch Zugabe von Polymyxin B ausgeschlossen werden, da die NF-κB-Aktivierung nicht durch Polymyxin B zu supprimieren war (23). Ebenso konnte gezeigt werden, dass MCP-1 in humanen Endothelzellen (HMEC-1) durch niedermolekulare OMPs induziert wird und dieser Effekt nicht durch Polymyxin B hemmbar ist (111), also kein LPS-abhängiger Prozess dafür verantwortlich sein kann.

Wegen der Bedeutung der OMPs als Adhäsine wird diskutiert, ob das NF-κB-regulierte ICAM-1 als möglicher Rezeptor für das 43 kDa OMP in Frage kommen könnte, wie es in ähnlicher Weise bereits für das Rhinovirus gezeigt werden konnte

(59). Hier induziert das Rhinovirus selbst seinen Rezeptor, das NF-κB regulierte ICAM-1 (122). Es ist bislang unklar, ob Komponenten des TIVSS, das für die Expression von IL-8 und ICAM-1 in infizierten Endothelzelen essentiell ist (138), einzelne dieser NF-κB aktivierenden OMPs darstellen. Dem VirB/VirD4 TIVSS wird eine Vielzahl von Funktionen im Infektionsverlauf von Endothelzellen zugeschrieben, u. a. Apoptoseinhibition, Aktivierung NF-κB-regulierter Gene sowie inhibitorische Effekte auf die Endothelzellproliferation (138), die Abgrenzung der OMPs von diesem TIVSS konnte jedoch bislang nicht näher analysiert werden.

Die Rolle der OMPs bei der Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort sollte in dieser Arbeit untersucht werden und von der Bedeutung für eine proinflammatorische Zellantwort abgegrenzt werden. Dafür wurden HeLa-Zellen und HUVECs mit OMPs WT und BadA$^-$ stimuliert und im ELISA die Zytokin-Induktion [IL-8 (HUVECs), VEGF (HeLa)] bestimmt (**Abb. 8**). Hierbei konnte gezeigt werden, dass OMPs übereinstimmend mit der Literatur (59) IL-8 im Sinne einer inflammatorischen Zellantwort induzieren, nicht jedoch eine OMP-abhängige VEGF-Induktion im Sinne einer proangiogenetischen Wirtszellantwort stattfindet. Tendenziell scheinen OMPs von *B. henselae* WT das NF-κB-regulierte IL-8 in HUVECs stärker zu induzieren als OMPs von *B. henselae* BadA$^-$. Diese Experimente stimmen mit der Beobachtung überein, wonach hitzegetötete *B. henselae* eine proinflammatorische Zellantwort triggern können (59), wohingegen die Viabilität von *B. henselae* für die Auslösung einer angiogenetischen Wirtszellantwort essentiell zu sein scheint. So konnte mit hitzegetöteten *B. henselae* nur eine geringe HIF-1-Aktivierung in HeLas erreicht werden (86).

4.1.3 Bedeutung von Lipopolysacchariden für die Induktion einer inflammatorischen Wirtszellantwort

Lipopolysaccharide (LPS) stellen eine Hauptkomponente der Membran gramnegativer Bakterien dar und sind als starker Induktor einer proinflammatorischen Wirtszellantwort bekannt. LPS binden dabei an einen TLR-4/CD14 Komplex, was in einer zur NF-κB-Aktivierung resultiert. Von *B. hensleae* und *B. quintana* ist bekannt, dass deren LPS im Gegensatz zu enterobakteriellem LPS über eine geringe endotoxische Aktivität verfügt, was auf einige strukturelle Besonderheiten zurückgeführt werden kann. *B. henselae*-LPS führt im Gegensatz zu

enterobakteriellem LPS nur zu einer schwachen Aktivierung des TLR-4 (161). Außer der Induktion einer proinflammatorischen Wirtszellantwort scheint LPS von *E. coli* in Makrophagen auch eine HIF-1 Aktivierung zu triggern (16), jedoch blieb hierbei letztlich unklar, ob das in diesen Experimenten verwendete LPS tatsächlich dafür verantwortlich ist oder ob es sich um eine Verunreinigung handelt, da eine entsprechende Polymyxin-B-Kontrolle nicht durchgeführt wurde. Bei der Stimulation epithelialer Zellen mit angereinigtem *B. henselae*-LPS konnte dagegen keine HIF-1 Aktivierung beobachtet werden (83).

In dieser Arbeit sollte ausgeschlossen werden, dass die proinflammatorische Endothelzellantwort LPS-abhängig induziert wird. Dies wurde anhand der IL-8-Sekretion nach Behandlung von HUVECs mit angereinigtem *B. henselae*-LPS überprüft (**Abb. 9**). Dabei ergab sich eindeutig, dass die IL-8-Sekretion im HUVECs-Zellkulturmodell nicht durch *B. henselae*-LPS stimulierbar ist. Dies stimmt mit Beobachtungen überein, wonach eine NF-κB-Aktivierung in Endothelzellen LPS-unabhängig und lediglich nach Exposition von Endothelzellen mit aufgereinigten *B. henselae*-OMPs nachweisbar ist (59).

4.2 BadA – Nur Adhäsin oder Induktor einer proangiogenetischen Wirtszellantwort?

Trimere Autotransporter-Adhäsine (TAA) stellen eine bedeutende Gruppe pathogener Virulenzfaktoren in gramnegativen Bakterien dar. Sie verfügen über eine modulare Struktur mit einer N-terminalen Kopfdomäne, einem kurzen Sequenzelement, das als *„neck“* bezeichnet wird, einer Stieldomäne und einem C-terminalen Membrananker und vermitteln die Adhärenz von Bakterien an die jeweiligen Wirtszellen (71). So wurde die essentielle Bedeutung von YadA für die Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle beschrieben (53). Durch Zugabe von Antikörpern gegen Fibronektin konnte die Invasion des Bakteriums in die Wirtszelle blockiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Invasion auf einer von der extrazellulären Matrix abhängigen Bindung zwischen YadA und der Wirtszelle beruht (52). Ähnliches wurde auch für BadA gezeigt: dieses scheint möglicherweise an β1-Integrine zu binden, wofür wahrscheinlich auch ein Fn-vermittelter Prozess verantwortlich sein könnte (131). Außerdem ist bekannt, dass die Bindung von YadA eine IL-8 Sekretion der Wirtszelle triggert (139). Für BadA wurde beschrieben, dass seine Expression entscheidend für die Auslösung einer proangiogenetischen Wirtszellanwort ist (131). Fraglich blieb bislang, ob BadA im Infektiosverlauf nur die Rolle eines Adhäsins zukommt und weitere Vorgänge in einer *B. henselae*-Infektion zur Auslösung einer angiogenetischen Antwort führen, oder ob BadA selbst eine proangiogenetische Wirtszellanwort induzieren kann.

Bislang wurde BadA nicht in voller Länge exprimiert. Diese Arbeit beschränkte sich daher auf die funktionelle Analyse der $BadA_{Kopf}$- und der $BadA_{Stiel}$-Domänen (**Abb. 23**). Dabei handelt es sich um Fragmente: der $BadA_{Kopf}$ ist ein ~42 kDa großes Protein, das die Aminosäuren 48-376 von BadA einschließt, der $BadA_{Stiel}$ ein kleines Fragment aus dem Übergang vom Kopf zum Stiel (~18 kDa, 480 bp), das die Aminosäuren 377-539 einschließt.

Über die Kopf-Domänen trimerer Autotransporter-Adhäsine ist bislang nicht viel bekannt. Viele TAA-Kopf-Domänen sind analog zu dem $YadA_{Kopf}$ aufgebaut, der aus einem Trimer einer einsträngigen β-Helix besteht (117). Die $YadA_{Kopf}$-Domäne bindet an Proteine der extrazellulären Matrix, bislang konnten die Bindungsstellen jedoch

noch nicht identifiziert werden. Die Kopf-Domäne von NadA, die nicht homolog zu derjenigen von YadA ist, scheint eine Adhärenz an Epithelzellen zu vermitteln (25). Die $BadA_{Kopf}$-Domäne folgt N-terminal auf eine putative Signalsequenz, wie sie bei BadA erstmals beschrieben wurde, und besteht aus einer Region, wie sie nur bei BadA vorkommt und einer Domäne mit elf Sequenzwiederholungen, die denen im $YadA_{Kopf}$ ähneln (131).

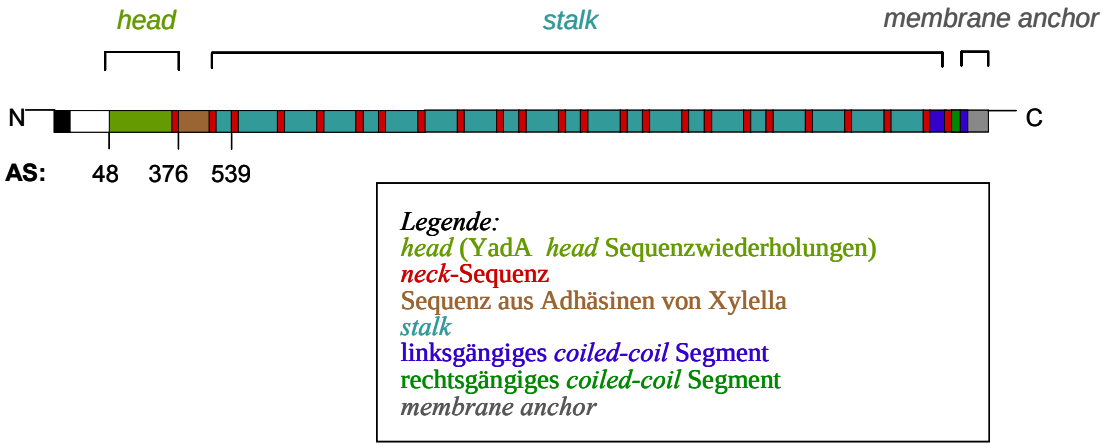


Abb. 23: Schematische Darstellung der Struktur von BadA mit N- und C-Termini. Das TAA BadA besteht N-terminal aus einer vermutlich globulären Kopfdomäne („*head*“), einem Stiel („*stalk*“) und einer C-terminalen Membran-Anker („*membrane anchor*“) Domäne. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten $BadA_{Kopf}$-Protein handelt es sich um ein ~42 kDa großes Protein, das die Aminosäuren 48-376 von BadA einschließt. Bei der $BadA_{Stiel}$-Domäne handelt es sich um ein kleines Fragment aus dem Übergang vom Kopf zum Stiel (~18 kDa, 480 bp), das die Aminosäuren 377-539 einschließt. AS: Aminosäure.

In dieser Arbeit sollte die $BadA_{Kopf}$-Domäne funktionell analysiert werden. Dafür wurde zunächst im Western Blot die Adhärenz des angereinigten Proteins an Endothel- und Epithelzellen untersucht, und in einem nächsten Schritt die Funktion dieser Domäne für die Induktion einer proangiogenetischen bzw. proinflammatorischen Wirtszellantwort analysiert. Dabei ließ sich im Western Blot eine deutliche Adhärenz der Kopf-Domäne an die Wirtszellen detektieren. Auffällig war die deutlich stärkere Adhärenz an Endothel- als an Epithelzellen (**Abb. 10**). Als mögliche Bindungsstelle von BadA werden β1-Integrine angenommen (131), dabei konnte eine deutlich stärkere Adhärenz von *B. henselae* an β1-Integrin-überexprimierende Fibroblasten festgestellt werden als an entsprechende Kontrollzellen. Somit kann spekuliert werden, dass auch die $BadA_{Kopf}$-Domäne an β1-Integrine bindet, die möglicherweise auf Endothelzellen stärker als auf Epithelzellen

exprimiert werden. Demzufolge war anzunehmen, dass viable *B. henselae* stärker an Endothel- als an Epithelzellen adhärieren, was letztlich auch gezeigt wurde (**Abb. 11**). Ob dies auf eine verstärkte β1-Integrin-Expression auf der Oberfläche der Zellen zurückzuführen ist oder ob unspezifische Effekte wie eine unterschiedliche Zahl an adhärenten Zellen am Boden der wells trotz standardisierter Zellzahl bei der Aussaat der Zellen für die Vesuchsergebnisse verantwortlich sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden und bleibt Gegenstand weiterer Analysen.

Weiterhin wurden die HIF-1-Aktivierung und die VEGF-Sekretion $BadA_{Kopf}$-stimulierter HeLa-Zellen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl HIF-1 als auch VEGF nach Zugabe von $BadA_{Kopf}$ aktiviert werden (**Abb. 12, Abb. 13**), wenngleich diese Induktion im Vergleich zu viablen *B. henselae* deutlich geringer ausfiel. Leider gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, die gereinigte BadA-Domäne z. B. auf Latex-Kugeln aufzubringen, die in idealer Weise ein korpuskuläres Element ähnlich einem BadA-exprimierenden Bakterium imitiert hätten.

Im HUVEC-Zellkulturmodell wurde zusätzlich die $BadA_{Kopf}$-induzierte IL-8-Sekretion als ein bedeutender Marker einer proinflammatorischen Zellantwort untersucht. Hier ergab sich zunächst eine deutliche Aktivierung der IL-8-Induktion, die nach Stimulation mit $BadA_{Kopf}$, der zuvor mit Proteinase K inaktiviert worden war, nicht mehr auftrat. Damit handelt es sich hierbei wohl um einen spezifischen, durch die $BadA_{Kopf}$-Domäne induzierten Effekt (**Abb. 13**). Die Aufreinigung der $BadA_{Kopf}$-Domäne erfolgte nach Expression in *E. coli* über eine Ni^{2+}-Sepharose-Säule. Demzufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass im Lösungspuffer (50 mM NaCl, 20 mM Tris, pH8) Spuren von Nickel enthalten sind. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 über Prolylhydroxylasen (PHDs) reguliert wird (21,54) und diese Eisen, das an Histidin- und Aspartatsäurereste gebunden wird, für ihre Aktivität benötigen (158). Die PHDs erfüllen die Funktion von Sauerstoffsensoren und können außer durch Sauerstoffmangel und Eisenchelatoren auch durch den Austausch von Metallionen (Kobalt, Nickel) inaktiviert werden (110). Es wäre demnach durchaus möglich, dass Spuren von Nickel im Lösungspuffer der $BadA_{Kopf}$-Domäne über eine Inaktivierung z. B. der PHD-2, dem Aktivitätsregulator von HIF-1, in einer Zunahme der Aktivität von HIF-1 und der Sekretion

proangiogenetischer Zytokine resultieren. Um diesen Mechanismus auszuschließen wurde das $BadA_{Kopf}$-Protein mit Proteinase K inaktiviert und Epithel- bzw. Endothelzellen mit diesem inaktivierten Protein stimuliert (**Abb. 13**). Die VEGF-Induktion in Epithelzellen war nach Stimulation mit Proteinase K-inaktiviertem $BadA_{Kopf}$ nur noch in geringem Maße nachweisbar. Dies spricht gegen eine Nickel-induzierte VEGF-Sekretion und damit für eine geringe Nickel-Konzentration im Lösungspuffer. Ebenso konnte eine VEGF-Induktion durch unspezifische Proteineffekte weitgehend ausgeschlossen werden, da nach Inkubation von HeLa-Zellen mit BSA keine VEGF-Induktion beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Bei den Stiel-Domänen trimerer Autotransporter-Adhäsine handelt es sich um hochrepetitive Strukturen, die sich als extrem längenvariabel darstellen und häufig *„coiled-coil“* Segmente enthalten. Die Stiel-Domänen stellen eine Art Pufferzone zwischen der bakteriellen Zelloberfläche und der Kopf-Domäne dar (Linke et al.). Der Stiel-Domäne von YadA wird außerdem eine Bedeutung beim Schutz des Bakteriums vor der Immunabwehr des Organismus zugeschrieben. Dabei bindet und inaktiviert der $YadA_{Stiel}$ Komplementfaktoren (133). Das in dieser Arbeit näher analysierte Protein stellt ein 18 kDa großes Fragment aus dem Stiel dar, das in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt wurde (131). Die Adhärenz und die Induktion einer Zytokinsekretion in Wirtszellen wurde mittels ELISA und Western Blot detektiert. Dabei ließ sich zeigen, dass das $BadA_{Stiel}$-Fragment an HUVECs konzentrationsabhängig adhäriert (**Abb. 14**) und in diesen auch eine IL-8-Sekretion auslöst (Daten nicht gezeigt). Tendenziell scheint das Stiel-Fragment jedoch weniger stark an Wirtszellen zu adhärieren als die Kopf-Domäne, was mit den Funktionen, die den YadA-Domänen zugeschrieben werden, weitgehend übereinstimmt (133). Eine Induktion der VEGF-Sekretion in $BadA_{Stiel}$-stimulierten HeLa-Zellen erscheint jedoch unwahrscheinlich, da nach Proteinase K-Inaktivierung des $BadA_{Stiel}$ noch immer eine VEGF-Induktion detektiert werden konnte. Damit beruht diese VEGF-Induktion am ehesten auf unspezifischen Effekten durch den Lösungspuffer, beispielsweise durch darin enthaltene Metallionen (s. oben).

Letztlich kann die Funktion der BadA-Domänen erst dann abschließend geklärt werden, wenn es gelingt, ein korpuskuläres Element zu schaffen, welches die

bakterielle Struktur besser imitiert. Funktionell kommt beiden untersuchten BadA-Domänen eine Bedeutung für die Adhärenz an ECs zu, wobei es möglich erscheint, dass dies über β1-Integrine stattfindet. Bemerkenswert erscheint, dass die Induktion einer proinflammatorischen Endothelzellantwort sowohl durch die BadA-Domänen als auch unabhängig von der BadA-Expression von einer BadA-defizienten Transposonmutante induziert werden kann. Im Verlauf einer Infektion mit *B. henselae* scheinen also abgesehen von BadA auch andere Pathogenitätsfaktoren für die Induktion einer entzündlichen Wirtszellantwort verantwortlich zu sein.

Sicher kommt BadA eine Schlüsselfunktion bei der Interaktion von *B. henselae* mit der Wirtszelle zu. Das Fehlen von BadA führt zu einer deutlich eingeschränkten Fibronektin- und Kollagenbindungsfähigkeit und zu einer deutlich verminderten Wirtszell-Adhärenz. (131). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Expression von BadA auch für den Invasionsprozess von Bedeutung, welche genauen Mechanismen dabei eine Rolle spielen, bleibt unklar. Das Fehlen von BadA führt außer zu verminderter Adhärenz auch zur Unterbindung weiterer Folgereaktionen einer *B. henselae*-Infektion (HIF-1-Aktivierung, Sekretion angiogenetischer Zytokine). Der Frage, ob BadA einzig für den Kontakt des Bakteriums mit der Wirtszelle verantwortlich ist oder selbst über angiogenetische Potenz verfügt, sollte in dieser Arbeit näher gekommen werden. Alternativ könnte die BadA-vermittelte Adhärenz von *B. henselae* auch die funktionelle Basis für eine Aktivierung des TIVSS von *B. henselae* herstellen, über das transolzierte Effektorproteine (Beps) in die Zellen eingeschleust werden könnten (119,142).

Die proangiogenetische Potenz von BadA konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, da dazu BadA und nicht nur einzelne Domänen funktionell untersucht werden sollten. In dieser Arbeit konnte jedoch erstmals die $BadA_{Kopf}$-Domäne in ihrer Bedeutung als proangiogenetischer Induktor dargestellt werden, wenngleich die proangiogenetische Potenz dieses Proteins eingeschränkt zu sein scheint. Um dies abschließend zu klären, sollte jedoch in weiteren Experimenten versucht werden, das Protein auf Latex-Kugeln aufzubringen und so die korpuskuläre Struktur eines Bakteriums besser zu imitieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl die $BadA_{Kopf}$- als auch die $BadA_{Stiel}$-Domäne über eine gewisse proinflammatorische Potenz verfügen.

4.3 BadA – ein neuer serodiagnostischer Marker im Verlauf von *Bartonella*-Infektionen?

Das Konzept der serologischen Diagnostik beruht auf dem Nachweis von spezifischen IgM- und IgG-Antikörpern, die im Rahmen einer Immunantwort gegen Mikroorganismen gebildet werden. Diese Methodik kommt im Besonderen dann zur Anwendung, wenn die Anzucht des Erregers nicht oder nur unter großen Mühen gelingt. Allerdings vergeht zwischen der Infektion und der Möglichkeit des Antikörpernachweises eine gewisse Zeit, verbunden mit einer diagnostischen Lücke. Zusätzlich kann bei immunsupprimierten Patienten eine Immunantwort mit Antikörperbildung ausbleiben und so die Interpretation der serologischen Diagnostik erheblich einschränken. Dies muss auch bei der Serodiagnostik von *Bartonella* spp.-Erkrankungen bedacht werden, die besonders bei immundefizienten Patienten auftreten. Diese Diagnostik erfolgt standardmäßig mittels IFT (1), einer zeitintensiven und durchaus vom Untersucher abhängigen Methode. In dieser Arbeit sollte erstmals der Western Blot als neue Methode zur serologischen Diagnostik getestet werden. Dazu sollte BadA auf seine Verwendbarkeit als serodiagnostischer Marker geprüft werden und die Kriterien zur Beurteilung von Analysemethoden diskutiert werden: (i) Reliabilität (Reproduzierbarkeit und Präzision), (ii) Validität und Vergleichbarkeit, (iii) Spezifität, (iv) Sensitivität, (v) Praktikabilität und Kosten (48).

Ähnlich wie NadA, dem eine protektive anti-NadA-Immunantwort in Mäusen zugesprochen wird (39), scheint es sich auch bei BadA um ein Oberflächenprotein zu handeln, das im Verlauf einer *B. henselae*-Infektion exprimiert wird und dem eine immunodominante Eigenschaft zukommt. Anti-BadA-Antikörper konnten sowohl im Blutserum von Patienten nachgewiesen werden, die an einer KKK oder BA erkrankt waren, als auch in Mäusen, die mit hitzegetöteten Bakterien immunisiert worden waren (131). Zusätzlich wurde die Möglichkeit diskutiert, BadA einer praktischen Anwendung bei der Vakzinierung von Katzen, denen eine große Bedeutung in der Epidemiologie von *B. henselae*-Erkrankungen zukommt, zuzuführen und damit eine mögliche Kontrolle über die *B. henselae*-Infektionen beim Menschen zu erhalten (118).

In dieser Arbeit sollte BadA als Marker im Immunoblot mit der Standardmethode des IFT (1) zum Nachweis von Infektionen mit *Bartonella henselae* verglichen werden. Im IFT getestete Patientenseren wurden im Immunoblot auf anti-BadA-Antikörper untersucht. Unter Einbeziehung von 34 IFT-positiven und 31 IFT-negativen Seren konnte im Vergleich zur Standardmethode eine Sensitivität von 73,5 % und eine Spezifität von 74,2 % berechnet werden. Der positive Vorhersagewert betrug 75,8 %, der negative Vorhersagewert 71,9 %. Dabei erwies sich die Nachweisbarkeit von anti-BadA-Antikörpern als weitgehend unabhängig von der IFT-Titerstufe. Über die Präzision sowie die Richtigkeit und Vergleichbarkeit des BadA-Immunoblots kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, da zu diesen Kriterien keine besonderen Testungen vorgenommen wurden. Die Reliabilität meint die Präzision als Kenngröße der zufälligen Fehler und kann über die Bestimmung der Repetierbarkeit und Reproduzierbarkeit kontrolliert werden. Zufällige Fehler kommen durch technische Mängel während der Durchführung der Messungen zustande und bewirken Abweichungen vom Soll-Ergebnis (48). Auch bei den Untersuchungen dieser Arbeit können zufällige Fehler vorgekommen sein, die Ergebnisse wurden jedoch mehrfach reproduziert. Es erscheint also wahrscheinlich, dass eine ausreichende Reliabilität in diesen Untersuchungen gewährleistet war. Die Validität (Richtigkeit, Übereinstimmung des Testresultats mit dem tatsächlichen Sachverhalt) ist ein weiteres Kriterium zur Beurteilung und zum Vergleich von Labormethoden. Zum Nachweis, dass es sich bei der detektierten Bande tatsächlich um die BadA-Bande und demzufolge auch um in Patientenseren enthaltene Antikörper gegen BadA handelt, wurden auch Ganzzelllysate einer BadA-defizienten Transposonmutante (131) im Immunoblot mit Patientenseren inkubiert. Die mit *B. henselae* BadA$^-$-Antigenen beschichteten Kontroll-Western Blots zeigten dabei in ~9 % der Fälle eine Bande, die ungefähr in der Höhe auftrat, in der sonst die BadA Bande nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Damit erscheint es wahrscheinlich, dass in den allermeisten Fällen spezifisch die BadA-Bande erfasst wurde.

Damit der BadA-Immunoblot für die Routinediagnostik angewendet werden könnte, müsste die Methodik für ein Routinelabor praktikabel sein. Dies scheint im Moment wegen der Vielzahl von Banden, die im Immunoblot detektierbar sind, schwerlich vorstellbar, da eine ausreichend präzise Bewertung der Ergebnisse so nur eingeschränkt möglich ist.

BadA ist Bestandteil einer neuen Gruppe trimerer Autotransporter-Adhäsine, unter denen YadA bisher am besten charakterisiert werden konnte. Gemeinsam ist diesen Adhäsinen eine modulare Struktur mit einer N-terminalen Kopfdomäne, einem kurzen Sequenzelement, das als *„neck“* bezeichnet wird, einer Stieldomäne und einem C-terminalen Membrananker (71). Wegen dieser strukturellen Homologien erscheint es möglich, dass Antikörper gegen YadA im Sinne einer Kreuzreaktivität auch gegen BadA reagieren. Eine ähnliche Kreuzreaktivität konnte im *Yersinia*-Immunoblot unter Verwendung von *Yersinia outer proteins* (Yops) nachgewiesen. Dabei reagierten Patientenseren, die Antikörper gegen *B. henselae*, *Brucella* spp., *Chlamydia pneumoniae* und *Borrelia burgdorferi* enthielten, im Sinne einer Kreuzreaktivität mit Yops (125). Demzufolge wurden in dieser Arbeit ausgewählte Patientenseren mit Antikörpern gegen *Yersinia* spp. im BadA-Immunoblot auf eine etwaige Kreuzreaktivität getestet (**Abb. 20**). Es konnte dabei bei keinem der eingesetzten, *Yersinia* spp.-Antikörper enthaltenden Patientenseren eine Reaktivität im BadA-Immunoblot nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktivität erscheint damit extrem unwahrscheinlich, auch wenn es sich um bislang kleine Fallzahlen handelt. Trotz der strukturellen Homologien der TAAs tritt somit keine Kreuzreaktivität auf, dies spricht für eine Verbesserung der Spezifität des BadA-Immunoblots, da beim Vorhandensein von Antikörpern gegen andere TAAs (z. B. YadA) keine falsch positiven Ergebnisse im BadA-Immunoblot zu erwarten sind.

Wegen der Vielzahl der detektierbaren Banden im Immunoblot gestaltet sich die Durchführung des BadA-Immunoblots schwierig. Gegenstand weiterer Untersuchungen war deshalb die Verwendung von BadA-Domänen im Immunoblot, da es bislang nicht gelungen ist, BadA in voller Länge zu exprimieren. Dazu wurde aufgereinigtes $BadA_{Kopf}$-Protein im Immunoblot mit ausgewählten Patientenseren getestet (**Abb. 21**). Dabei waren $BadA_{Kopf}$-Antikörper in allen IFT-postiven Patientenseren nachweisbar, ebenso wie in der Hälfte der untersuchten IFT-negativen Patientenseren. Auch bei Herstellung von Verdünnungsreihen ließ sich die Spezifität dieses Immunoblots nicht verbessern. Sicher handelt es sich bei diesem Experiment um keine repräsentative Untersuchung, da insgesamt nur acht Patientenseren untersucht wurden. Es erscheint allerdings sehr wahrscheinlich, dass die $BadA_{Kopf}$-Domäne kein hinreichend spezifischer Marker ist. Dabei muss jedoch die Ähnlichkeit der Kopf-Domänen („*head*“) vieler TAAs, für die eine strukturelle und

funktionelle Kongruenz beschrieben wurde (99), bedacht werden. Somit könnte auch eine Kreuzreaktivität der Antikörper gegen die Kopf-Domäne trimerer Autotransporter-Adhäsine bestehen, auch wenn in dieser Arbeit eine Kreuzreaktivität zwischen YadA und BadA weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Dies sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Leider konnten im Rahmen dieser Arbeit aus methodischen Gründen die Ergebnisse des BadA-Immunoblots nicht mit dem klinischen Erscheinungsbild der Bartonellose korreliert werden. Somit kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob das Auftreten von BadA-Antikörpern mit der Schwere des klinischen Verlaufs korreliert. Auch ist es nicht möglich, den für Kliniker wichtigen positiven und negativen Vorhersagewert des BadA-Immunoblots zu bestimmen.

In dieser Arbeit wurden zusätzlich weitere Proteinbanden, die im Western Blot detektiert werden konnten, auf ihre Verwendbarkeit für die serologische Diagnostik überprüft. Es gestaltete sich jedoch abgesehen von einigen Proteinbanden im niedermolekularen Bereich zwischen ~15 und ~20 kDa, schwierig, Proteinbanden zu identifizieren, mit denen IFT-positive von IFT-negativen Patientenseren zu differenzieren waren. Dies ist nicht zuletzt darauf zurückzuführen, dass eine Vielzahl von Proteinbanden auf den Western Blot Streifen dicht beieinander liegen und demzufolge schlecht differenziert werden können. Es könnte sein, dass bei den Antikörpern gegen diese Proteine, die bei IFT-positiven und IFT-negativen Patientenseren nachweisbar sind, eine große Kreuzreaktivität mit ähnlichen Proteinen anderer Bakterien vorkommt.

Wie gezeigt werden konnte, verfügt der BadA-Immunoblot über eine 73,5 %-ige Sensitivität und eine Spezifität von 74,2 %. Es erscheint sinnvoll, den BadA-Immunoblot als im Rahmen einer Zweistufendiagnostik zusammen mit einem noch sensitiveren diagnostischen Test zum Einsatz zu bringen. So könnten Patientenseren mittels IFT auf Antikörper gescreent werden und das Ergebnis in einem zweiten Schritt mittels Immunoblot bestätigt werden. Ein solches Verfahren ist beispielsweise für die Diagnostik von *Yersinia* spp.- oder *Borrelia* spp.-Erkrankungen bekannt und kommt immer dann zum Einsatz, wenn kein einzelnes diagnostisches Verfahren hinreichend spezifisch und sensitiv ist.

4.4 Ausblick: BadA in Diagnostik und Therapie

In dieser Arbeit wurde das TAA BadA einerseits funktionell näher analysiert, andererseits auf eine mögliche Verwendbarkeit in der serologischen Diagnostik untersucht.

Die serodiagnostische Bedeutung von BadA konnte in Rahmen dieser Arbeit erstmals analysiert werden. Langfristig erscheint der Einsatz von BadA zur Diagnostik von *Bartonella*-Infektionen sicherlich sinnvoll, jedoch muss notwendigerweise die Praktikabilität der Interpretation des BadA-Immunoblots verbessert werden. Sollte es gelingen, BadA in voller Länge zu exprimieren und dieses auf Western Blot Streifen aufzubringen, könnte damit ein sinnvolles Diagnostikum entwickelt werden. Alternativ könnte versucht werden, immunodominante BadA-Domänen zu identifizieren und in der serologischen Diagnostik einzusetzen. Letztendlich könnte der BadA-Immunoblot einen Bestätigungstest im Rahmen einer Zweistufendiagnostik von *Bartonella* spp.-Infektionen darstellen.

Bei chronisch ischämischen Erkrankungen wurde der alleinige Einsatz von VEGF zur Stimulation des Gefäßwachstums versucht, lieferte aber bislang enttäuschende Ergebnisse (56). Stabile Gefäße sind wahrscheinlich auf eine wohldosierte Mischung aus angiogenetisch wirksamen Substanzen angewiesen, deswegen scheint die gleichzeitige Applikation verschiedener angiogenetischer Zytokine erfolgsversprechender zu sein (24,27). Die Aktivierung von HIF-1 in bakteriellen Infektionen ist unbestritten, im Falle einer Infektion mit *B. henselae* handelt es sich bei dieser angiogenetischen Reprogrammierung um einen BadA-abhängigen Prozess (131). Die therapeutische Aktivierung von HIF-1 über bakterielle Faktoren von *B. henselae* könnte somit einen kompletten „angiogenetischen Cocktail“ zur Therapie ischämischer Erkrankungen darstellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kopf-Domäne von BadA die Induktion angiogenetisch wirksamer Substanzen bewirken kann.

Eine *B. henselae*-Infektion humaner endothelialer Stammzellen führt zu einer Aktivierung des angiogenetischen Genprogramms und zu einer beschleunigten

endothelialen Differenzierung (Mändle & Kempf, nicht publiziert). Da die Applikation endothelialer Stammzellen möglicherweise einen vielversprechenden Therapieansatz in ischämischen Erkrankungen darstellt (101,102), wäre es durchaus vorstellbar, dass die angiogenetische Programmierung dieser Zellen z. B. durch den Einsatz von BadA auch *in vivo* beschleunigt ablaufen und als eine mögliche Therapieoption ischämischer Erkrankungen zum Einsatz kommen könnte.

Sollte sich im Rahmen weiterer Untersuchungen bestätigen lassen, dass BadA ein deutlicher Induktor einer angiogenetischen Reprogrammierung von Wirtszellen ist, könnte der Einsatz von BadA langfristig ein vielversprechendes neues Therapiekonzept chronisch ischämischer Erkrankungen darstellen.

5 Zusammenfassung

Infektionen mit *Bartonella henselae* resultieren in den vaskuloproliferativen Krankheitsbildern Bazilläre Angiomatose und Peliosis hepatis. Endothelzellen stellen dabei die wahrscheinlichen Zielzellen einer *B. henselae* Infektion dar. Das trimere Autotransporter-Adhäsin BadA ist einer der wenigen identifizierten Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae* und ist u. a. für die Adhärenz der Bakterien an die Wirtszelle und die Induktion einer angiogenetischen Wirtszellantwort entscheidend.

In der vorliegenden Arbeit sollte (i) die proangiogenetische, HIF-1-regulierte von der proinflammatorischen, NF-κB-regulierten Endothelzellantwort nach einer *B. henselae*-Infektion abgegrenzt werden, (ii) der Einfluss von BadA auf die Wirtszellantwort näher analysiert werden und (iii) die Bedeutung weiterer Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae* (LPS, OMPs) für die Auslösung der beschriebenen Wirtszellantwort näher beleuchtet werden.

Außerdem sollte analysiert werden, inwieweit sich BadA als serologischer Marker zur Diagnostik von *Bartonella*-Erkrankungen eignet.

Die vorliegende Arbeit lieferte folgende Ergebnisse:

1. Die Adhärenz von *B. henselae* an HUVECs findet BadA-vermittelt statt, auch für den Invasionsprozess in ECs scheint BadA von Bedeutung zu sein.
2. In HUVECs wird eine proangiogenetische, HIF-1-regulierte Wirtszellantwort in Abhängigkeit der BadA-Expression induziert, während eine proinflammatorische, NF-κB-regulierte Wirtszellantwort unabhängig von der BadA-Expression aktiviert werden kann. Ebenso wird die Map-Kinase p38 in HUVECs BadA-vermittelt aktiviert.
3. *Outer membrane proteins* von *B. henselae* induzieren in HUVECs eine IL-8 Sekretion, vermitteln jedoch keine VEGF-Induktion in HeLa-Zellen.
4. Lipopolysacchariden von *B. henselae* kommen keine Bedeutung bei der Aktivierung von IL-8 im Sinne einer proinflammatorischen Endothelzellantwort zu.

5. Die angereinigte $BadA_{Kopf}$-Domäne adhäriert an Endothelzellen (HUVECs) stärker als an Epithelzellen (HeLa-Zellen). Eine $BadA_{Kopf}$-induzierte HIF-1-Aktivierung in HeLa-Zellen konnte im Western Blot nachgewiesen werden. Ebenso konnte eine $BadA_{Kopf}$-vermittelte VEGF-Sekretion in Epithelzellen ebenso wie eine IL-8-Sekretion in Endothelzellen im ELISA nachgewiesen werden.
6. Der angereinigte $BadA_{Stiel}$ adhärierte ebenfalls an HUVECs und induzierte eine Sekretion von IL-8, nicht dagegen eine Sekretion des proangiogenetischen VEGF in HeLa-Zellen.
7. Der BadA-Immunoblot als neue serodiagnostische Methode wies in dieser Arbeit eine Sensitivität von 73,5 % und eine Spezifität von 74,2% auf (positiver Vorhersagewert: 75,8 %, negativer Vorhersagewert 71,9 %). Eine Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern gegen YadA und BadA konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die Abhängigkeit der Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort in Endothelzellen von der BadA-Expression auf *B. henselae* sowie die angiogenetische Potenz der Kopf-Domäne von BadA an sich. Es stellte sich weiterhin heraus, dass die Aktivierung einer inflammatorischen Endothelzellantwort BadA-unabhängig und nicht LPS-getriggert stattfindet. *Outer membrane proteins* könnten demnach für eine entzündliche Endothelzellantwort verantwortlich sein, einzelne OMPs wurden jedoch nicht näher identifiziert.

Mit dieser Arbeit konnte damit ein Beitrag zur funktionellen Analyse der Pathogenitätsfaktoren, insbesondere von BadA, von *B. henselae* geleistet werden und der Frage nachgegangen werden, wie *B. henselae* eine angiogenetische Reprogrammierung in Wirtszellen induziert. Daraus könnten sich in der Zukunft Anstöße zu neuen Therapieoptionen ischämischer Erkrankungen ergeben.

6 Literaturverzeichnis

1. Serodiagnosis of Emerging Infectious Diseases: *Bartonella* and *Ehrlichia* Infections (course manual). Centers of Disease Control and Prevention. Atlanta, USA. 1999.
2. **Adal, K. A., C. J. Cockerell, and J. Petri-WA**. 1994. Cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and other infections due to *Rochalimaea*. N. Engl. J. Med. **330**:1509-1515.
3. **Aggarwal, B. B.** 2004. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. Cancer Cell **6**:203-208.
4. **Alsmark, C. M., A. C. Frank, E. O. Karlberg, B. A. Legault, D. H. Ardell, B. Canback, A. S. Eriksson, A. K. Naslund, S. A. Handley, M. Huvet, S. B. La, M. Holmberg, and S. G. Andersson**. 2004. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **101**:9716-9721.
5. **Amano, Y., J. Rumbea, J. Knobloch, J. Olson, and M. Kron**. 1997. Bartonellosis in Ecuador: serosurvey and current status of cutaneous verrucous disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. **57**:174-179.
6. **Anderson, B., C. Goldsmith, A. Johnson, I. Padmalayam, and B. Baumstark**. 1994. Bacteriophage-like particle of *Rochalimaea henselae*. Mol. Microbiol **13**:67-73.
7. **Anderson, B., E. Lu, D. Jones, and R. Regnery**. 1995. Characterization of a 17-kilodalton antigen of *Bartonella henselae* reactive with sera from patients with cat scratch disease. J Clin. Microbiol **33**:2358-2365.
8. **Anderson, B. E. and M. A. Neuman**. 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin. Microbiol Rev **10**:203-219.
9. **Arias-Stella, J., P. H. Lieberman, R. A. Erlandson, and J. Arias-Stella, Jr.** 1986. Histology, immunohistochemistry, and ultrastructure of the verruga in Carrion's disease. Am. J. Surg. Pathol. **10**:595-610.
10. **Barton, A. L.** 1909. Descripción de elementos endo-globulares hallados en las enfermos de fiebre verrucosa. La Crónica Médica de Lima **26**:7-10.
11. **Bass, J. B., Jr., L. S. Farer, P. C. Hopewell, R. O'Brien, R. F. Jacobs, F. Ruben, D. E. Snider, Jr., and G. Thornton**. 1994. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention. Am. J Respir. Crit Care Med **149**:1359-1374.
12. **Bass, J. W., J. M. Vincent, and D. A. Person**. 1997. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. Pediatr. Infect. Dis. J. **16**:163-179.

13. **Batterman, H. J., J. A. Peek, J. S. Loutit, S. Falkow, and L. S. Tompkins**. 1995. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. Infect. Immun. **63**:4553-4556.

14. **Benson, L. A., S. Kar, G. McLaughlin, and G. M. Ihler**. 1986. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. Infect. Immun. **54**:347-353.

15. **Birtles, R. J., T. G. Harrison, N. A. Saunders, and D. H. Molyneux**. 1995. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella,* with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**:1-8.

16. **Blouin, C. C., E. L. Page, G. M. Soucy, and D. E. Richard**. 2004. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. Blood **103**:1124-1130.

17. **Brenner, D. J., S. P. O'Connor, H. H. Winkler, and A. G. Steigerwalt**. 1993. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. Int. J. Syst. Bacteriol. **43**:777-786.

18. **Brenner, S. A., J. A. Rooney, P. Manzewitsch, and R. L. Regnery**. 1997. Isolation of *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae:* effects of methods of blood collection and handling. J Clin. Microbiol. **35**:544-547.

19. **Brouqui, P., B. LaScola, V. Roux, and D. Raoult**. 1999. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. N. Engl. J. Med. **340**:184-189.

20. **Brouqui, P. and D. Raoult**. 1996. *Bartonella quintana* invades and multiplies within endothelial cells *in vitro* and *in vivo* and forms intracellular blebs. Res. Microbiol **147**:719-731.

21. **Bruick, R. K. and S. L. McKnight**. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Science **294**:1337-1340.

22. **Burgess, A. W. and B. E. Anderson**. 1998. Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. Microb. Pathog. **25**:157-164.

23. **Burgess, A. W., J. Y. Paquet, J. J. Letesson, and B. E. Anderson**. 2000. Isolation, sequencing and expression of *Bartonella henselae* omp43 and predicted membrane topology of the deduced protein. Microb. Pathog. **29**:73-80.

24. **Cao, R., E. Brakenhielm, R. Pawliuk, D. Wariaro, M. J. Post, E. Wahlberg, P. Leboulch, and Y. Cao**. 2003. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. Nat. Med **9**:604-613.

25. **Capecchi, B., J. du-Bobie, M. F. Di, L. Ciucchi, V. Masignani, A. Taddei, R. Rappuoli, M. Pizza, and B. Arico**. 2005. *Neisseria meningitidis* NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells. Mol. Microbiol **55**:687-698.

26. **Carithers, H. A.** 1985. Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. Am. J. Dis. Child **139**:1124-1133.

27. **Carmeliet, P.** 2003. Angiogenesis in health and disease. Nat. Med. **9**:653-660.

28. **Carmeliet, P.** 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat. Med. **6**:389-395.

29. **Carmeliet, P. and R. K. Jain**. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature **407**:249-257.

30. **Caron, K. M. and O. Smithies**. 2001. Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **98**:615-619.

31. **Cerimele, F., L. F. Brown, F. Bravo, G. M. Ihler, P. Kouadio, and J. L. Arbiser**. 2003. Infectious Angiogenesis: *Bartonella bacilliformis* Infection Results in Endothelial Production of Angiopoetin-2 and Epidermal Production of Vascular Endothelial Growth Factor. Am. J Pathol. **163**:1321-1327.

32. **Chien, A., D. B. Edgar, and J. M. Trela**. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. J. Bacteriol. **127**:1550-1557.

33. **Chilton, M. D., M. H. Drummond, D. J. Merio, D. Sciaky, A. L. Montoya, M. P. Gordon, and E. W. Nester**. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell **11**:263-271.

34. **Chomczynski, P. and N. Sacchi**. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. **162**:156-159.

35. **Chomel, B. B.** 2000. Cat-scratch disease. Rev. Sci. Tech. **19**:136-150.

36. **Chomel, B. B., R. W. Kasten, K. Floyd-Hawkins, B. Chi, K. Yamamoto, J. Roberts-Wilson, A. N. Gurfield, R. C. Abbott, N. C. Pedersen, and J. E. Koehler**. 1996. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. J. Clin. Microbiol. **34**:1952-1956.

37. **Chomel, B. B., R. W. Kasten, J. E. Sykes, H. J. Boulouis, and E. B. Breitschwerdt**. 2003. Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals. Ann. N. Y. Acad. Sci. **990**:267-278.

38. **Chong, T. W., L. D. Horwitz, J. W. Moore, H. M. Sowter, and A. L. Harris**. 2002. A mycobacterial iron chelator, desferri-exochelin, induces hypoxia-inducible factors 1 and 2, NIP3, and vascular endothelial growth factor in cancer cell lines. Cancer Res. **62**:6924-6927.

39. **Comanducci, M., S. Bambini, B. Brunelli, J. Adu-Bobie, B. Arico, B. Capecchi, M. M. Giuliani, V. Masignani, L. Santini, S. Savino, D. M. Granoff, D. A. Caugant, M. Pizza, R. Rappuoli, and M. Mora**. 2002. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. J Exp. Med **195**:1445-1454.

40. **Conley, T., L. Slater, and K. Hamilton**. 1994. *Rochalimaea* species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro. J Lab Clin. Med **124**:521-528.

41. **Cooper, T. G.** 1981. Biochemische Arbeitsmethoden. Gryter, Berlin .

42. **Debré, R., M. Lamy, M. L. Jammet, L. Costil, and P. Mozziconacci**. 1950. La maladie des griffes du chat. Bull. Mem. Soc. Med. Hop. **66**:76-79.

43. **Dehio, C.** 2004. Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. Annu. Rev. Microbiol. **58**:365-390.

44. **Dehio, C.** 2001. *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. Trends Microbiol **9**:279-285.

45. **Dehio, C.** 2003. Recent progress in understanding *Bartonella*-induced vascular proliferation. Curr. Opin. Microbiol **6**:61-65.

46. **Dehio, C., M. Meyer, J. Berger, H. Schwarz, and C. Lanz**. 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.

47. **Dehio, C. and A. Sander**. 1999. *Bartonella* as emerging pathogens. Trends Microbiol **7**:226-228.

48. **Dörner, K.** 1992. Klinische Chemie. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

49. **Dramsi, S. and P. Cossart**. 1998. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **14**:137-166.

50. **Drancourt, M., R. Birtles, G. Chaumentin, F. Vandenesch, J. Etienne, and D. Raoult**. 1996. New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. Lancet **347**:441-443.

51. **Dvorak, H. F., J. A. Nagy, D. Feng, L. F. Brown, and A. M. Dvorak**. 1999. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **237**:97-132.

52. **Eitel, J. and P. Dersch**. 2002. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. Infect. Immun. **70**:4880-4891.

53. **el Tahir, Y. and M. Skurnik**. 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. Int. J. Med. Microbiol. **291**:209-218.

54. **Epstein, A. C., J. M. Gleadle, L. A. McNeill, K. S. Hewitson, J. O'Rourke, D. R. Mole, M. Mukherji, E. Metzen, M. I. Wilson, A. Dhanda, Y. M. Tian, N. Masson, D. L. Hamilton, P. Jaakkola, R. Barstead, J. Hodgkin, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, C. J. Schofield, and P. J. Ratcliffe**. 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell **107**:43-54.

55. **Ferrara, N.** 1999. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **237**:1-30.

56. **Ferrara, N. and K. Alitalo**. 1999. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. Nat. Med. **5**:1359-1364.

57. **Folkman, J.** 1984. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? Lab Invest **51**:601-604.

58. **Folkman, J., E. Merler, C. Abernathy, and G. Williams**. 1971. Isolation of a tumor factor responsible or angiogenesis. J Exp. Med. **133**:275-288.

59. **Fuhrmann, O., M. Arvand, A. Gohler, M. Schmid, M. Krull, S. Hippenstiel, J. Seybold, C. Dehio, and N. Suttorp**. 2001. *Bartonella henselae* induces NF-kappaB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. Infect. Immun. **69**:5088-5097.

60. **Garcia, F. U., J. Wojta, K. N. Broadley, J. M. Davidson, and R. L. Hoover**. 1990. *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells *in vitro* and is angiogenic *in vivo*. Am. J. Pathol. **136**:1125-1135.

61. **Ghosh, S. and M. Karin**. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell **109 Suppl**:S81-S96.

62. **Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp**. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu. Rev. Immunol. **16**:225-260.

63. **Gilmore, R. D., Jr., T. M. Bellville, S. L. Sviat, and M. Frace**. 2005. The *Bartonella vinsonii* subsp. arupensis Immunodominant Surface Antigen BrpA Gene, Encoding a 382-Kilodalton Protein Composed of Repetitive Sequences, Is a Member of a Multigene Family Conserved among *Bartonella* Species. Infect. Immun. **73**:3128-3136.

64. **Grassl, G. A., M. Kracht, A. Wiedemann, E. Hoffmann, M. Aepfelbacher, C. von Eichel-Streiber, E. Bohn, and I. B. Autenrieth**. 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.

65. **Hanahan, D. and J. Folkman**. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell **86**:353-364.

66. **Heesemann, J. and R. Laufs**. 1985. Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. J Clin. Microbiol. **22**:168-175.

67. **Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, and J. P. Nataro**. 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. Trends Microbiol. **6**:370-378.

68. **Hendrix, L. R.** 2000. Contact-dependent hemolytic activity distinct from deforming activity of *Bartonella bacilliformis*. FEMS Microbiol. Lett. **182**:119-124.

69. **Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith**. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N. Y.) **10**:413-417.

70. **Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson**. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N. Y.) **11**:1026-1030.

71. **Hoiczyk, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann**. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. EMBO J **19**:5989-5999.

72. **Holtmann, H., R. Winzen, P. Holland, S. Eickemeier, E. Hoffmann, D. Wallach, N. L. Malinin, J. A. Cooper, K. Resch, and M. Kracht**. 1999. Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. Mol. Cell Biol. **19**:6742-6753.

73. **Hultgren, S. J., S. Abraham, M. Caparon, P. Falk, G. J. St, III, and S. Normark**. 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. Cell **73**:887-901.

74. **Jackson, L. A., D. H. Spach, D. A. Kippen, N. K. Sugg, R. L. Regnery, M. H. Sayers, and W. E. Stamm**. 1996. Seroprevalence to *Bartonella quintana* among patients at a community clinic in downtown Seattle. J. Infect. Dis. **173**:1023-1026.

75. **Jacomo, V., P. J. Kelly, and D. Raoult**. 2002. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). Clin. Diagn. Lab Immunol. **9**:8-18.

76. **Josko, J. and M. Mazurek**. 2004. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. Med. Sci. Monit. **10**:RA89-RA98.

77. **Kallio, P. J., K. Okamoto, S. O'Brien, P. Carrero, Y. Makino, H. Tanaka, and L. Poellinger**. 1998. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. EMBO J. **17**:6573-6586.

78. **Kallio, P. J., W. J. Wilson, S. O'Brien, Y. Makino, and L. Poellinger**. 1999. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. J. Biol. Chem. **274**:6519-6525.

79. **Kampik, D., R. Schulte, and I. B. Autenrieth**. 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.

80. **Karin, M. and Y. Ben-Neriah**. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. Annu. Rev. Immunol. **18**:621-663.

81. **Karkkainen, M. J., P. Haiko, K. Sainio, J. Partanen, J. Taipale, T. V. Petrova, M. Jeltsch, D. G. Jackson, M. Talikka, H. Rauvala, C. Betsholtz, and K. Alitalo**. 2004. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. Nat. Immunol. **5**:74-80.

82. **Kempf, V. A., N. Hitziger, T. Riess, and I. B. Autenrieth**. 2002. Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? Trends Microbiol **10**:269-275.

83. **Kempf, V. A., M. Lebiedziejewski, K. Alitalo, J. H. Walzlein, U. Ehehalt, J. Fiebig, S. Huber, B. Schutt, C. A. Sander, S. Muller, G. Grassl, A. S. Yazdi, B. Brehm, and I. B. Autenrieth**. 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.

84. **Kempf, V. A., A. Schairer, D. Neumann, G. A. Grassl, K. Lauber, M. Lebiedziejewski, M. Schaller, P. Kyme, S. Wesselborg, and I. B. Autenrieth**. 2005. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. Cell Microbiol. **7**:91-104.

85. **Kempf, V. A., M. Schaller, S. Behrendt, B. Volkmann, M. Aepfelbacher, I. Cakman, and I. B. Autenrieth**. 2000. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. Cell Microbiol **2**:431-441.

86. **Kempf, V. A., B. Volkmann, M. Schaller, C. A. Sander, K. Alitalo, T. Riess, and I. B. Autenrieth**. 2001. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. Cell Microbiol **3**:623-632.

87. **Kirby, J. E. and D. M. Nekorchuk**. 2002. *Bartonella*-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **99**:4656-4661.

88. **Kitamura, K., K. Kangawa, M. Kawamoto, Y. Ichiki, S. Nakamura, H. Matsuo, and T. Eto**. 1993. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. **192**:553-560.

89. **Koch, A. E., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, L. A. Harlow, L. A. DiPietro, V. M. Elner, S. G. Elner, and R. M. Strieter**. 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. Science **258**:1798-1801.

90. **Koehler, J. E., C. A. Glaser, and J. W. Tappero**. 1994. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. JAMA **271**:531-535.

91. **Koehler, J. E., P. E. LeBoit, B. M. Egbert, and T. G. Berger**. 1988. Cutaneous vascular lesions and disseminated cat-scratch disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. Ann. Intern. Med. **109**:449-455.

92. **Koehler, J. E., M. A. Sanchez, C. S. Garrido, M. J. Whitfeld, F. M. Chen, T. G. Berger, M. C. Rodriguez-Barradas, P. E. LeBoit, and J. W. Tappero**. 1997. Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. N. Engl. J. Med. **337**:1876-1883.

93. **Koehler, J. E. and J. W. Tappero**. 1993. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis. **17**:612-624.

94. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.

95. **Lebiedziejewski, M.** 2005. Analyse der *Bartonella henselae*-induzierten angiogenetischen Wirtszellanwort. Dissertation.

96. **Lei, Y., H. K. Haider, J. Shujia, and E. S. Sim**. 2004. Therapeutic angiogenesis. Devising new strategies based on past experiences. Basic Res. Cardiol. **99**:121-132.

97. **Leung, D. W., G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel, and N. Ferrara**. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science **246**:1306-1309.

98. **Li, Q. and I. M. Verma**. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. Nat. Rev. Immunol. **2**:725-734.

99. **Linke, D., Riess, I. B. Autenrieth, A. Lupas, and V. A. Kempf**. 2006. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *In Press.*

100. **Livak, K. J., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz**. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl. **4**:357-362.

101. **Losordo, D. W. and S. Dimmeler**. 2004. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. Circulation **109**:2487-2491.

102. **Losordo, D. W. and S. Dimmeler**. 2004. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. Circulation **109**:2692-2697.

103. **Maeno, N., H. Oda, K. Yoshiie, M. R. Wahid, T. Fujimura, and S. Matayoshi**. 1999. Live *Bartonella henselae* enhances endothelial cell proliferation without direct contact. Microb. Pathog. **27**:419-427.

104. **Maguina, C., P. J. Garcia, E. Gotuzzo, L. Cordero, and D. H. Spach**. 2001. Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. Clin. Infect. Dis. **33**:772-779.

105. **Mahon, P. C., K. Hirota, and G. L. Semenza**. 2001. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. Genes Dev. **15**:2675-2686.

106. **Mändle, T., H. Einsele, M. Schaller, D. Neumann, W. Vogel, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf**. 2005. Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. Blood **106**:1215-1222.

107. **Matera, G., M. C. Liberto, A. Quirino, G. S. Barreca, A. G. Lamberti, M. Iannone, E. Mancuso, E. Palma, F. A. Cufari, D. Rotiroti, and A. Foca**. 2003. *Bartonella quintana* lipopolysaccharide effects on leukocytes, CXC chemokines and apoptosis: a study on the human whole blood and a rat model. Int. Immunopharmacol. **3**:853-864.

108. **Maurin, M., R. Birtles, and D. Raoult**. 1997. Current knowledge of *Bartonella* species. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **16**:487-506.

109. **Maurin, M. and D. Raoult**. 1996. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* infections. Clin. Microbiol. Rev. **9**:273-292.

110. **Maxwell, P. and K. Salnikow**. 2004. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. Cancer Biol. Ther. **3**:29-35.

111. **McCord, A. M., A. W. Burgess, M. J. Whaley, and B. E. Anderson**. 2005. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells promotes monocyte/macrophage chemoattractant protein 1 gene expression and protein production and triggers monocyte migration. Infect. Immun. **73**:5735-5742.

112. **Metzen, E., U. Berchner-Pfannschmidt, P. Stengel, J. H. Marxsen, I. Stolze, M. Klinger, W. Q. Huang, C. Wotzlaw, T. Hellwig-Burgel, W. Jelkmann, H. Acker, and J. Fandrey**. 2003. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. J. Cell Sci. **116**:1319-1326.

113. **Meyer, M., M. Clauss, A. Lepple-Wienhues, J. Waltenberger, H. G. Augustin, M. Ziche, C. Lanz, M. Buttner, H. J. Rziha, and C. Dehio**. 1999. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. EMBO J. **18**:363-374.

114. **Mitchell, S. J. and M. F. Minnick**. 1995. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. Infect. Immun. **63**:1552-1562.

115. **Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich**. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **51 Pt 1**:263-273.

116. **Musso, T., R. Badolato, D. Ravarino, S. Stornello, P. Panzanelli, C. Merlino, D. Savoia, R. Cavallo, A. N. Ponzi, and M. Zucca**. 2001. Interaction of *Bartonella henselae* with the murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response. Infect. Immun. **69**:5974-5980.

117. **Nummelin, H., M. C. Merckel, J. C. Leo, H. Lankinen, M. Skurnik, and A. Goldman**. 2004. The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. EMBO J **23**:701-711.

118. **Olsen, C. W.** 1999. Vaccination of cats against emerging and reemerging zoonotic pathogens. Adv. Vet. Med. **41**:333-346.

119. **Padmalayam, I., K. Karem, B. Baumstark, and R. Massung**. 2000. The gene encoding the 17-kDa antigen of *Bartonella henselae* is located within a cluster of genes homologous to the virB virulence operon. DNA Cell Biol. **19**:377-382.

120. **Pahl, H. L.** 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene **18**:6853-6866.

121. **Palmari, J., N. Teysseire, C. Dussert, and D. Raoult**. 1996. Image cytometry and topographical analysis of proliferation of endothelial cells *in vitro* during *Bartonella* (*Rochalimaea*) infection. Anal. Cell Pathol. **11**:13-30.

122. **Papi, A. and S. L. Johnston**. 1999. Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased NF-kappaB-mediated transcription. J Biol. Chem. **274**:9707-9720.

123. **Pilegaard, H., C. Keller, A. Steensberg, J. W. Helge, B. K. Pedersen, B. Saltin, and P. D. Neufer**. 2002. Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes. J Physiol **541**:261-271.

124. **Pridmore, A. C., D. H. Wyllie, F. Abdillahi, L. Steeghs, L. P. van der, S. K. Dower, and R. C. Read**. 2001. A lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* elicits attenuated cytokine release by human macrophages and signals via toll-like receptor (TLR) 2 but not via TLR4/MD2. J. Infect. Dis. **183**:89-96.

125. **Rawlins, M. L., C. Gerstner, H. R. Hill, and C. M. Litwin**. 2005. Evaluation of a Western blot method for the detection of *Yersinia* Antibodies: evidence of serological cross-reactivity between *Yersinia* outer membrane proteins and *Borrelia burgdorferi*. Clin. Diagn. Lab Immunol. **12**:1269-1274.

126. **Regnery, R. L., B. E. Anderson, J. E. Clarridge, B. M. Rodriguez, D. C. Jones, and J. H. Carr**. 1992. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, R. henselae sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. J Clin. Microbiol. **30**:265-274.

127. **Regnery, R. L., J. G. Olson, B. A. Perkins, and W. Bibb**. 1992. Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. Lancet **339**:1443-1445.

128. **Resto-Ruiz, S. I., M. Schmiederer, D. Sweger, C. Newton, T. W. Klein, H. Friedman, and B. E. Anderson**. 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**:4564-4570.

129. **Ricort, J. M. and M. Binoux**. 2004. Insulin-like growth factor binding protein-3 stimulates phosphatidylinositol 3-kinase in MCF-7 breast carcinoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **314**:1044-1049.

130. **Ridder, G. J., C. C. Boedeker, K. Technau-Ihling, R. Grunow, and A. Sander**. 2002. Role of cat-scratch disease in lymphadenopathy in the head and neck. Clin. Infect. Dis. **35**:643-649.

131. **Riess, T., S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Walzlein, U. Ehehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf**. 2004. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. J Exp. Med **200**:1267-1278.

132. **Risau, W.** 1997. Mechanisms of angiogenesis. Nature **386**:671-674.

133. **Roggenkamp, A., N. Ackermann, C. A. Jacobi, K. Truelzsch, H. Hoffmann, and J. Heesemann**. 2003. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. J Bacteriol. **185**:3735-3744.

134. **Rolain, J. M., S. B. La, Z. Liang, B. Davoust, and D. Raoult**. 2001. Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. J. Clin. Microbiol. **39**:2978-2980.

135. **Scadden, D. T.** 2003. AIDS-related malignancies. Annu. Rev. Med. **54**:285-303.

136. **Scherer, D. C., I. Buron-Connors, and M. F. Minnick**. 1993. Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of antiflagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. Infect. Immun. **61**:4962-4971.

137. **Schmid, M. C., M. Bisoffi, A. Wetterwald, E. Gautschi, G. N. Thalmann, S. Mitola, F. Bussolino, and M. G. Cecchini**. 2003. Insulin-like growth factor binding protein-3 is overexpressed in endothelial cells of mouse breast tumor vessels. Int J Cancer **103**:577-586.

138. **Schmid, M. C., R. Schulein, M. Dehio, G. Denecker, I. Carena, and C. Dehio**. 2004. The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. Mol. Microbiol. **52**:81-92.

139. **Schmid, Y., G. A. Grassl, O. T. Buhler, M. Skurnik, I. B. Autenrieth, and E. Bohn**. 2004. *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. Infect. Immun. **72**:6780-6789.

140. **Schmidt, H. U., T. Kaliebe, J. Poppinger, C. Buhler, and A. Sander**. 1996. Isolation of *Bartonella quintana* from an HIV-positive patient with bacillary angiomatosis. Eur. J Clin. Microbiol Infect. Dis. **15**:736-741.

141. **Schmiederer, M. and B. Anderson**. 2000. Cloning, sequencing, and expression of three *Bartonella henselae* genes homologous to the *Agrobacterium tumefaciens* VirB region. DNA Cell Biol. **19**:141-147.

142. **Schmiederer, M., R. Arcenas, R. Widen, N. Valkov, and B. Anderson**. 2001. Intracellular induction of the *Bartonella henselae* virB operon by human endothelial cells. Infect. Immun. **69**:6495-6502.

143. **Schmitz, M. L., S. Bacher, and M. Kracht**. 2001. I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. Trends Biochem. Sci. **26**:186-190.

144. **Schmitz, M. L., I. Mattioli, H. Buss, and M. Kracht**. 2004. NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. Chembiochem. **5**:1348-1358.

145. **Schulein, R., P. Guye, T. A. Rhomberg, M. C. Schmid, G. Schroder, A. C. Vergunst, I. Carena, and C. Dehio**. 2005. A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **102**:856-861.

146. **Schulte, R., G. A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C. A. Jacobi, M. Schaller, P. J. Nelson, and I. B. Autenrieth**. 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. FASEB J 2000. Aug. ;14. (11.):1471. -84. **14**:1471-1484.

147. **Semenza, G. L.** 2001. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. Pediatr. Res. **49**:614-617.

148. **Semenza, G. L.** 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis. Curr. Opin. Genet. Dev. **8**:588-594.

149. **Slater, L. N., D. F. Welch, and K. W. Min**. 1992. *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. Arch. Intern. Med. **152**:602-606.

150. **Sodhi, A., S. Montaner, V. Patel, M. Zohar, C. Bais, E. A. Mesri, and J. S. Gutkind**. 2000. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. Cancer Res. **60**:4873-4880.

151. **Spach, D. H., A. S. Kanter, M. J. Dougherty, A. M. Larson, M. B. Coyle, D. J. Brenner, B. Swaminathan, G. M. Matar, D. F. Welch, R. K. Root, and .** 1995. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. N. Engl. J. Med. **332**:424-428.

152. **Stein, A. and D. Raoult**. 1995. Return of trench fever. Lancet **345**:450-451.

153. **Sutter, C. H., E. Laughner, and G. L. Semenza**. 2000. Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **97**:4748-4753.

154. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon**. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. Biotechnology **24**:145-149.

155. **Verma, A., G. E. Davis, and G. M. Ihler**. 2000. Infection of human endothelial cells with *Bartonella bacilliformis* is dependent on Rho and results in activation of Rho. Infect. Immun. **68**:5960-5969.

156. **Wang, G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue, and G. L. Semenza**. 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**:5510-5514.

157. **Wellmann, S., T. Taube, K. Paal, V. E. Graf, W. Geilen, G. Seifert, C. Eckert, G. Henze, and K. Seeger**. 2001. Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. Clin. Chem. **47**:654-660.

158. **Wenger, R. H.** 2002. Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression. FASEB J. **16**:1151-1162.

159. **Willett, C. G., Y. Boucher, T. E. di, D. G. Duda, L. L. Munn, R. T. Tong, D. C. Chung, D. V. Sahani, S. P. Kalva, S. V. Kozin, M. Mino, K. S. Cohen, D. T. Scadden, A. C. Hartford, A. J. Fischman, J. W. Clark, D. P. Ryan, A. X. Zhu, L. S. Blaszkowsky, H. X. Chen, P. C. Shellito, G. Y. Lauwers, and R. K. Jain**. 2004. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. Nat. Med. **10**:145-147.

160. **Windsor, J. J.** 2001. Cat-scratch disease: epidemiology, aetiology and treatment. Br. J. Biomed. Sci. **58**:101-110.

161. **Zahringer, U., B. Lindner, Y. A. Knirel, W. M. Van Den Akker, R. Hiestand, H. Heine, and C. Dehio**. 2004. Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. J. Biol. Chem. **279**:21046-21054.

162. **Zhang, P., B. B. Chomel, M. K. Schau, J. S. Goo, S. Droz, K. L. Kelminson, S. S. George, N. W. Lerche, and J. E. Koehler**. 2004. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **101**:13630-13635.

163. **Zimmermann, R., V. A. Kempf, E. Schiltz, K. Oberle, and A. Sander**. 2003. Hemin binding, functional expression, and complementation analysis of Pap 31 from *Bartonella henselae*. J Bacteriol. **185**:1739-1744.

7 Abkürzungen

In der folgenden Aufführung nicht enthalten sind Abkürzungen für SI-Einheiten, deren Vorsilben sowie Elemente des Periodensystems und Aminosäuren.

A.	*Agrobacterium*
Abb.	Abbildung
ADM	Adrenomedullin
AIDS	*aquired immune deficiency syndrom*
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B.	*Bartonella*
BA	Bazilläre Angiomatose
BadA	*Bartonella* Adhäsin A
Bep	*Bartonella-translocated effector protein*
B2M	β2-Mikroglobulin
bp	Basenpaare
BSA	*bovine serum albumine*
bzw.	beziehungsweise
cDNA	*copy DNA*
CFU	*colony forming unit*
CLSM	*confocal laser scanning microscopy*
Cy5	Indodicarbocyanin
d	Tag
DAB	3,3`-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4`-6-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DIF	Doppelimmunfluoreszenz
DFO	Desferrioxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*deoxyribonucleic acid*

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.	*Escherichia*
EB	*elution buffer*
EC	Endothelzelle
ECL	*enhanced chemo luminescence*
EDTA	Ethylen-Diamin-N,N,N`,N`- Tetraacetat
EGF	*epidermal growth factor*
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
FCS	*fetal calf serum*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT-1	*fms-related tyrosine kinase-1*
Fn	Fibronektin
g	Erdbeschleunigung
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure)
HHV-8	Humanes Herpesvirus-8
HIF	*hypoxia inducible factor*
HIV	*human immunodeficiency virus*
HK 2	Hexokinase 2
HMEC	*human microvascular endothelial cell*
H_2O	Wasser
H_2O_{dest}	einfach destilliertes Wasser
H_2O_{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
HRE	*hypoxia responsive element*
HRP	*horse-radish peroxidase*
HUVEC	*human umbilical vein endothelial cell*
ial	Invasion-assoziierter Locus
ICAM	*intracellular adhesion molecule*
Ig	Immunglobulin

IGFBP-3	*insulin-like growth factor binding protein-3*
IL	Interleukin
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
KDR	*kinase insert domain receptor*
KKK	Katzenkratzkrankheit
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccarid
M	molar
MCP-1	*monocyte chemotactic protein-1*
min	Minute
MOI	*multiplicity of infection*
ml	Milliliter
NF-κB	Nukleärer Faktor- κB
OD	Optische Dichte
OMP	*outer membrane protein*
OV	Orf-Virus
PBS	*phosphate buffered saline* (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	*polymerase chain reaction*
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	*post infectionem* (nach Infektion)
PHD	Prolylhydroxylase
PMA	Phorbol-12 Myristat-13 Azetat
PMSF	Phenylmethansulfon-Säurefluorid
PNPP	P-Nitrophenyl-Phosphat
RNA	*ribonucleic acid*
rpm	*round per minute*
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	*Salmonella*
sec	Sekunde
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
SI	Stimulationsindex

s. o.	siehe oben
spp.	Spezies
T	Thymidin
TAA	trimeres Autotransporter-Adhäsin
Tab.	Tabelle
Taq	*Termophilus aquaticus*
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethyl-Ethylendiamin
TIVSS	Typ IV-Sekretionssystem
TLR	*toll like receptor*
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	*unit* (Einheit)
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
Y.	*Yersinia*
YadA	*Yersinia* Adhäsin A
YOP	*Yersinia outer protein*
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

8 Anhang

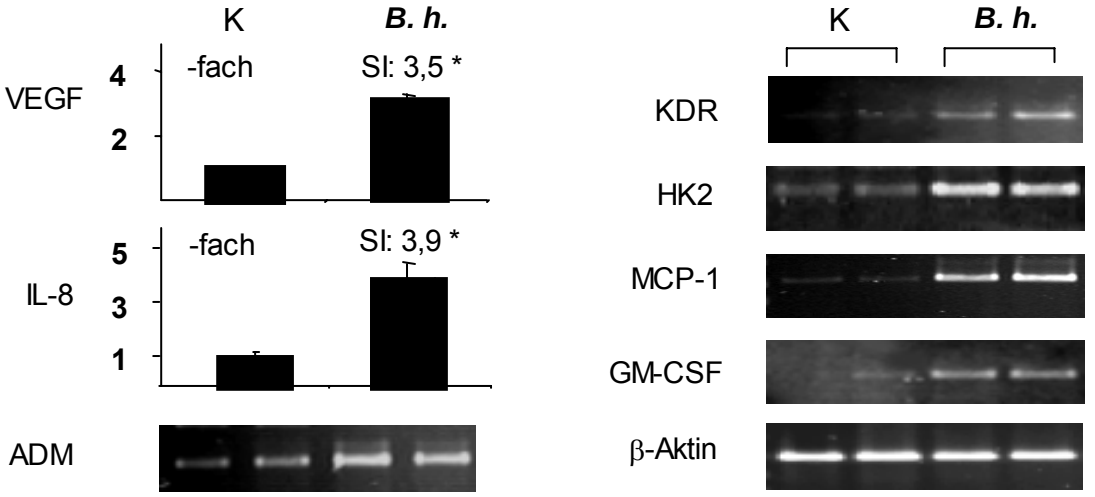


Abb. 24: Geninduktion in Endothelzellen (HUVECs) 6 h nach *B. henselae*-Infektion. HUVECs wurden mit *B. henselae* infiziert, 6 h inkubiert und die jeweilige Geninduktion mittels semi-quantitativer (ADM, KDR, HK2, MCP-1, GM-CSF) und Real-Time-PCR (VEGF, IL-8) bestimmt. Interne Kontrolle: β-Aktin (semiquantitative PCR), β_2-Mikroglobulin (Real-Time-PCR). K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, SI: Stimulationsindex, *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Negativkontrolle. Entnommen aus (95).

Tab. 17: Induzierte Gene in Endothelzellen (HUVEC) 6h nach *B. henselae*-Infektion. Entnommen aus (95).

Nr.	Gen (hochregulierte Gene)	Abkürzung	Induktion Array[a] (U133A)	Biologische Funktion[b]	Genbank Zugangszahl
1.	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	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, anti-apoptotisch	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	anti-kanzerogen	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	Zell-Adhäsion	NM_000201
15.	nuclear factor of kappalight polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	4,11	NF-κB Inhibitor	NM_020529
16.	FK506 binding protein 8	FKBP8	4,0	Signaltransduktion, anti-apoptotisch	NM_012181
17.	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	TNFAIP3	3,92	Regulation der Transkription, anti-apoptotisch	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

Nr.	Gen (hochregulierte Gene)	Abkürzung	Induktion Array[a] (U133A)	Biologische Funktion[b]	Genbank Zugangszahl
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	Tumorsupressor	NM_001711
27.	B-cell CLL/lymphoma 3	BCL3	2,95	Regulierung der NF-κB-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	HMGA1	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	FOS	2,71	Transkription vom Pol2 Promotor, AP-1 Untereinheit	NM_005252
32.	vascular endothelial growth factor	VEGF	2,69	angioproliferativ	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

Nr.	Gen (hochregulierte Gene)	Abkürzung	Induktion Array[a] (U133A)	Biologische Funktion[b]	Genbank Zugangszahl
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, GLUT3	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-1 responsive RTP801	RTP801	2,07	anti-apoptotisch	NM_019058
50.	sprouty homolog 2	SPRY2	2,06	Regulation der Signaltransduktion	NM_005842
51.	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDIA	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-monooxygenase 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 synthase 2	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	Ca^{2+} Bindeprotein,	NM_006184
60.	bone morphogenetic protein 2	BMP2	1,91	Wachstumsfaktor, Signaltransduktion	NM_001200
61.	serine proteinase inhibitor, clade B, member 2	SERPINB2	1,89	anti-apoptotisch	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

Nr.	Gen (hochregulierte Gene)	Abkürzung	Induktion Array[a] (U133A)	Biologische Funktion[b]	Genbank Zugangszahl
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
70.	chromosome 6 open reading frame 62	C6orf62	0,58	unbekannt	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

[a] Die Analyse von zwei voneinander unabhängigen Datensets wurde auf dem Affymetrix Microarray suite 5.0 und Affymetrix Data Mining Tool 3.0 durchgeführt.

[b] Die biologischen Funktionen wurden der Datenbank *Gene ontology* (http://www.geneontology.org) entnommen

9 Publikationen

Aus dieser Arbeit bislang hervorgegangene Publikationen:

Riess T., **Wagner, C.L**., Andersson, S.G., Lupas, A., Schaller, M., Nordheim, A., Autenrieth, I.B. and Kempf, V.A.J. Functional Analysis of *Bartonella* adhesin A (Poster). Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, 18.10.2005 (ausgezeichnet mit dem Posterpreis des Promotionskollegs „Molekulare Medizin“).

Wagner, C.L., Riess T. and Kempf V.A.J. Functional Analysis of the *Bartonella* adhesin A-modulated host cell response (Vortrag). Workshop der DFG-Forschergruppe “Bacterial cell envelope: Synthesis, Function, Target”, Freudenstadt,18.-19.05.2006.

Wagner, C.L., Riess, T., Linke D., and Kempf V.A.J. Functional Analysis of the *Bartonella* adhesin A-modulated host cell response (Poster). 100. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 1.-4.10.2006.

Wagner, C.L., Riess, T., Linke D., Schäfer, A., Reutter, S., Maggi R.G. and Kempf V.A.J. Use of Bartonella adhesin A (BadA) immunoblotting in the serodiagnosis of Bartonella henselae infections (Poster). 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Göttingen, 30.9.-3.10.2007.

Wagner, C.L., Riess, T., Linke, D., Eberhardt, C., Schäfer, A., Reutter, S., Kempf, V.A.J. Use of *Bartonella* adhesin A (BadA) immunoblotting in the serodiagnosis of *Bartonella henselae* infections. Int J Med Microbiol. **298(7-8)**:579-90.

Kaiser, P.O., Riess, T., **Wagner, C.L.**, Linke, D., Lupas, A.N., Schwarz, H., Raddatz, G., Schäfer, A., Kempf, V.A.J. The head domain of *Bartonella* adhesin A is crucial for host cell interaction of *Bartonella henselae.* Cell Microbiol. 2008 Nov;**10(11)**:2223-34.

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Volkhard Kempf danke ich herzlich für seine umfangreiche Betreuung und Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft, seinen unerschöpflichen Enthusiasmus für das Thema dieser Arbeit sowie die kritische und geduldige Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. I. Autenrieth danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Bei Dr. Tanja Rieß bedanke ich mich für ihre fortwährende Unterstützung und eine Vielzahl von hilfreichen Tipps, die das Arbeiten deutlich erleichtert haben, sowie für das zügige und gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt ebenso Andrea Schäfer und Diana Neumann für ihre umfangreiche Hilfestellung in der Einarbeitungsphase und ihre Unterstützung bei vielen Experimenten, ohne die diese Arbeit niemals fertiggestellt worden wäre. Sabine Reutter danke ich für ihre Mitarbeit bei den diagnostisch orientierten Versuchen. Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich herzlich für die schöne Arbeitsatmosphäre im Labor, ihre Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie für ihre Funktion als „Seelentröster“, die sie oft genug übernommen hat. Gleichzeitig danke ich Tanja Mändle, Tanja Rieß, Diana Neumann, Andrea Schäfer und Christian Eberhardt für schöne Erlebnisse über den Laboralltag hinaus. Tanja Mändle und Andrea Schäfer danke ich für das geduldige Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Klaus Dietz für seine umfangreiche Hilfestellung bei der statistischen Aufarbeitung der Versuchsdaten.

Bei meinen Kommilitonen, besonders Eva Hihn, Mark-Christian Eberle, Jochen Schneider, Christina Löw und Sarah Schott bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der Aufarbeitung des Klausurstoffs, wenn das Studieren wegen der Laborarbeit vernachlässigt wurde. Besonders danke ich auch Melanie und Monika Quarz sowie Claudia Booz, die sich liebevoll um Mias gekümmert haben, wenn die Laborarbeit mal wieder vorging.

Mein herzlicher Dank gilt Kay Hammer für seine fortwährende Geduld, mit der er allen Problemen rund um diese Arbeit begegnete, sein Verständnis und Unterstützung und nicht zuletzt seine Ausdauer bei der Lösung sämtlicher computertechnischer Probleme.

Für meine Eltern, die mich während dieser Arbeit fortwährend ermutigt und unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Carola Liane Wagner
Geburtsdatum:	12.10.1981
Geburtsort:	Wertingen, Bayern

Schulausbildung:

1988 – 1990	Volksschule Westendorf
1990 – 1992	Schillerschule Esslingen-Berkheim
1992 – 2001	Heinrich-Heine Gymnasium Ostfildern
1997	Schulaufenthalt am Chesterton Community College, Cambridge, GB
2001	Abitur mit der Note „sehr gut“ (1,0)

Studium:

2001 – 2007	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10.09.2003	1. Staatsexamen
12.11.2007	2. Staatsexamen

Promotion:

02/2004 – 04/2006	Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zum Thema „Funktionelle Analyse von *Bartonella* Adhäsin A“, betreut durch Prof. Dr. V. Kempf, gefördert durch das Promotionskolleg „Molekulare Medizin“ des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Tübingen

Berufliche Tätigkeit:

Seit 12/2007	Ärztin an der Medizinischen Klinik, Abteilung II, Hämatologie, Onkologie, Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie des Universitätsklinikums Tübingen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. L. Kanz)