

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

**Aktivierung von *Hypoxia-Inducible Factor-1* (HIF-1)
und Induktion proangiogenetischer Zytokine
nach Infektion mit *Bartonella henselae***

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

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

**vorgelegt von
Urs Thorsten Eehalt
aus
Sinsheim**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. I. B. Autenrieth

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Kandolf

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Die Gattung <i>Bartonella</i>	1
1.1.1	Taxonomie und Geschichte	1
1.1.2	Mikrobiologische Charakteristika von <i>Bartonella</i> spp.	2
1.1.3	Das klinische Bild der Infektion mit <i>B. henselae</i>	3
1.1.3.1	Katzenkratzkrankheit (<i>cat scratch disease</i> , CSD)	3
1.1.3.2	Bazilläre Angiomatose (BA)	4
1.1.3.3	Peliosis hepatis (PH)	5
1.1.4	Epidemiologie	5
1.1.5	Diagnose und Therapie	6
1.1.6	Pathogenese von <i>Bartonella</i> -Infektionen	7
1.2	Angiogenese	9
1.2.1	Proangiogenetisch wirksame Zytokine	11
1.2.2	Das Zytokin <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	11
1.2.2.1	Regulation der VEGF-Induktion	12
1.2.3	Das Zytokin Interleukin-8 (IL-8)	12
1.2.4	Die Zytokine Adrenomedullin (ADM) und <i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3</i> (IGFBP-3)	13
1.2.5	Der Transkriptionsfaktor <i>Hypoxia-Inducible Factor-1</i> (HIF-1)	13
1.2.6	Die Rolle der <i>Mitogen-Activated Protein</i> (MAP)-Kinasen in der Angiogenese	16
1.2.7	Induktion eines proangiogenetischen Genmusters durch <i>B. henselae</i>	18
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	18

2	<u>Material und Methoden</u>	20
2.1	Material	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3	Chemikalien	22
2.1.4	Antibiotika	23
2.1.5	Rekombinante Zytokine	23
2.1.6	Antikörper	23
2.1.7	Größenstandards	23
2.1.8	Medien	24
2.1.9	Bakterienstämme	25
2.1.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.1.11	Western blot	26
2.1.12	ELISA	26
2.1.12.1	VEGF-ELISA	26
2.1.12.2	IL-8-ELISA	26
2.1.13	Zellyse-Puffer	27
2.1.14	Sonstiges	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Bakterien	28
2.2.1.1	Herstellung und Kultivierung von Bakterien für <i>in vitro</i> -Experimente	28
2.2.1.2	Anzucht von <i>B. henselae</i> BadA ⁻	29
2.2.2	Zellkultur	29
2.2.2.1	Kultivierung von HeLa-Zellen	29
2.2.2.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	30
2.2.2.3	Infektionsexperimente	30
2.2.2.4	Modulation der Infektionsexperimente: Zugabe von MAP-Kinase-Inhibitoren	31
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	32

2.2.3.1	Präparation von Proteinextrakten zur Bestimmung von HIF-1 α	32
2.2.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	32
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.2.3.4	Western blot	34
2.2.4	Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen: ELISA	35
2.2.4.1	Gewinnung von Zellkulturüberständen	35
2.2.4.2	ELISA	35
2.2.4.3	VEGF-ELISA	36
2.2.4.4	IL-8-ELISA	36
2.2.5	Adhäsionsexperiment von <i>B. henselae</i> WT, <i>B. henselae</i> Pil ⁻ und <i>B. henselae</i> BadA ⁻ an Kollagen	37
2.2.6	Statistik	38
3	<u>Ergebnisse</u>	39
3.1	Zytokin-Induktion durch <i>B. henselae</i>	39
3.1.1	Nachweis der VEGF-Induktion nach Infektion mit <i>B. henselae</i> mittels ELISA	39
3.1.2	Nachweis der IL-8-Induktion nach Infektion mit <i>B. henselae</i> mittels ELISA	40
3.1.3	Nachweis der Induktion von ADM und IGFBP-3 nach Infektion mit <i>B. henselae</i> mittels RIA (<i>radio immuno assay</i>)	41
3.1.4	Einfluss der Expression von BadA auf die proangiogenetische Zytokin-Induktion nach Infektion mit <i>B. henselae</i>	44
3.2	Einfluss der Expression von BadA auf die Kollagenbindungsfähigkeit von <i>B. henselae</i>	45
3.3	Nachweis der Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 durch <i>B. henselae</i>	47

3.3.1	Nachweis von HIF-1 α im Western blot	47
3.4	Zytokin-Induktion von <i>B. henselae</i> unter Anwesenheit von MAP-Kinase-Inhibitoren	48
3.4.1	Hemmung der durch <i>B. henselae</i> hervorgerufenen Zytokin-Induktion durch p38-MAP-Kinase-Inhibitor	48
3.4.2	Hemmung der durch <i>B. henselae</i> hervorgerufenen Zytokin-Induktion durch MEK1-Inhibitor	50
3.5	Hemmung der IL-8-Induktion durch NF-κB-Inhibitor Parthenolid	52
3.6	Zytokin-Induktion durch <i>B. henselae</i> und andere Bakterien	53
3.7	Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 durch <i>B. henselae</i> und andere Bakterien	55
4	<u>Diskussion</u>	57
4.1	Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort durch <i>B. henselae</i>	57
4.1.1	Induktion von VEGF in HeLa-Zellen nach Infektion mit <i>B. henselae</i>	57
4.1.2	Induktion weiterer angiogenetisch wirksamer Zytokine durch <i>B. henselae</i>	58
4.2	Aktivierung von HIF-1 nach Infektion mit <i>B. henselae</i>	61
4.3	Aktivierung von HIF-1 in Folge bakterieller Infektionen	64
4.3.1	Aktivierung von HIF-1 nach bakteriellen Infektionen: eine konservierte Reaktion der Zelle?	66

4.4	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB nach Infektion mit <i>B. henselae</i>	67
4.5	Die Rolle der MAP-Kinasen an der Aktivierung von HIF-1	68
4.6	Das Oberflächenprotein <i>Bartonella</i> Adhäsion A (BadA)	70
4.6.1	Interaktion von BadA mit Komponenten der extrazellulären Matrix	70
4.6.2	Die Rolle von BadA an der Induktion angiogenetisch wirksamer Zytokine	70
4.7	Die Rolle des <i>B. henselae</i>-induzierten angiogenetischen Cocktails im ‚paracrine loop model‘	72
4.8	Ausblick	75
5	<u>Zusammenfassung</u>	77
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	79
7	<u>Abkürzungen</u>	98
8	<u>Anhang</u>	102
9	<u>Publikationen</u>	105
10	<u>Danksagung</u>	106
11	<u>Lebenslauf</u>	107

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Bartonella*

1.1.1 Taxonomie und Geschichte

Die Gattung *Bartonella* umfasst zur Zeit 16 Spezies, von denen allerdings nur sieben als humanpathogen angesehen werden: *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. clarridgeiae*, *B. vinsonii* und *B. grahamii*³⁹.

Die Identifikation von Spezies der Gattung *Bartonella* als Erreger der Katzenkratzkrankheit (*B. henselae*), des Schützengrabenfiebers (*B. quintana*), der Bazillären Angiomatose (BA), der Peliosis hepatis (PH) und von Endokarditiden (*B. henselae* und *B. quintana*) sowie eine immer größer werdende Liste an klinischen Manifestationsformen unterstreicht die steigende Bedeutung der Erreger.

Das zuerst entdeckte Bakterium der Gattung war *B. bacilliformis*, der Erreger der Carrion'schen Krankheit. Diese Bartonellose, die nur endemisch in den Anden Südamerikas auftritt und von Sandfliegen der Gattungen *Lutzomyia* und *Phlebotomus* auf den Menschen übertragen wird, verläuft in zwei Phasen. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis sechs Wochen kommt es zu einer von intermittierendem Fieber begleiteten hämolytischen Anämie mit hoher Letalität (Oroya-Fieber). Überlebt der Infizierte die erste Phase, kann es nach Wochen oder Monaten zum Auftreten von noduloverrukösen, teleangiektatischen Papeln - den Verruga peruana - an Gesicht und Extremitäten kommen¹⁴³.

B. quintana, der Erreger des Fünf-Tage-Fiebers¹⁷², rief während des Ersten Weltkrieges große Epidemien unter den alliierten Soldaten der Westfront hervor, weswegen die Krankheit auch den Namen Schützengrabenfieber erhielt. Die Erkrankung zeichnet sich durch plötzlich einsetzende Kopfschmerzen, aseptische Meningitis, persistierendes Fieber sowie andere unspezifische Symptome aus und wird von Mensch zu Mensch durch die Kleiderlaus, *Pediculus humanus corporis*, übertragen. Mit dem Rückgang der Epidemien nach dem Ende des Zweiten Weltkrieges nahm auch das

Interesse an *B. quintana* ab, bis das Bakterium 1992 als einer der Erreger der BA identifiziert wurde⁹⁷.

B. henselae konnte erstmals 1990 aus dem Blut einer HIV-Infizierten isoliert und als Ursache von Fieber und Bakteriämien identifiziert werden¹⁶⁸. Ferner wurde *B. henselae* mit der Entstehung der BA^{140,187} und weiteren Krankheitsbildern (s. **Kap. 1.1.3**) in Verbindung gebracht^{136,138,171}. 1992 wurde *B. henselae* charakterisiert und zu Ehren der medizinisch-technischen Assistentin Diane Hensel benannt¹³⁷.

In jüngster Vergangenheit wurde es erst dank neuerer diagnostischer Methoden ermöglicht, *Bartonella* spp. als Verursacher bisher ätiologisch ungeklärter Endokarditiden zu enthüllen, wobei v.a. *B. quintana* als der häufigste Erreger isoliert werden konnte. Zwei neue Spezies, *B. elizabethae* und *B. clarridgeia*, sowie auch *B. henselae*, wurden ebenfalls als Erreger subakut und chronisch verlaufender Endokarditiden identifiziert³⁵.

Lange Zeit zählte alleine *B. bacilliformis* zur Gattung *Bartonella*. Erst 1993, nachdem die große genetische und molekularbiologische Übereinstimmung (16S rRNA und DNA-Analysen) zwischen den Bakterien der Gattung *Rochalimaea* und *B. bacilliformis* festgestellt worden war¹²⁸, wurden alle Spezies der Gattung *Rochalimaea* der Gattung *Bartonella* zugeordnet¹³.

Die Gattung *Bartonella* gehört zur Alpha-Subdivision der Proteobakterien; nächste Verwandte sind *Brucella*, *Agrobacterium* und *Rhizobium*¹¹⁸. Die beiden Letztgenannten sind Auslöser von Pflanzentumoren (s. **Kap. 1.1.6**)¹⁹³.

1.1.2 Mikrobiologische Charakteristika von *Bartonella* spp.

Bei der Gattung *Bartonella* handelt es sich um gramnegative, fakultativ-intrazellulär wachsende Stäbchen, die auf unbelebten Nährmedien nur langsam wachsen. Die Bakterien sind etwa 2 µm lang und 0,5 - 0,6 µm breit¹³⁷. *In vitro* ist *B. henselae* nur in Zellkultur oder auf Schokoladen-, Kochblut- oder Hämin-angereichertem Agar bei 37 °C, erhöhter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultivierbar⁴⁴. In Flüssigkulturmedien wächst *B. henselae* nur unzureichend (Replikation in zehn Tagen etwa 100fach)⁴⁴. Bei Kultivierung auf Blut-Agar sind bis zum Auftreten sichtbarer Kolonien bei Erstisolation Inkubationszeiten von

zwei bis fünf Wochen nötig, durch weiteres Passagieren lässt sich diese Zeitspanne verkürzen. In Flüssigkeit weist *B. henselae* Motilität auf, die möglicherweise auf Pilusexpression zurückzuführen ist. Nach längeren Passagezeiten auf Blut-Agar verlieren die Bakterien diese Eigenschaft zum Teil jedoch wieder ⁶.

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

Die Gattung *Bartonella* ist verantwortlich für eine Vielzahl an klinischen Manifestationsformen. Diese reichen von spezifischen Krankheitsbildern wie der Carrión'schen Krankheit, dem Schützengrabenfieber, der Katzenkratzkrankheit, der BA und der PH bis zu unspezifischen Manifestationsformen wie Endokarditis, Osteomyelitis, Enzephalitis und Sepsis. Gemeinsam ist all diesen Krankheitsbildern, dass die Zielzelle für die Gattung *Bartonella* wahrscheinlich die Endothelzelle darstellt.

1.1.3.1 Katzenkratzkrankheit (*cat scratch disease, CSD*)

Die CSD manifestiert sich typischerweise bei Immunkompetenten als lokalisierte Lymphadenopathie, die meist, ohne dass Antibiotika-Gabe notwendig wäre, innerhalb von 6 - 12 Wochen selbstlimitierend verläuft. Nach Kratz- oder Bissverletzung durch eine Katze bildet sich an der Stelle der Hautläsion eine Papel oder Pustel aus, der nach einer Latenzzeit von 7 – 40 Tagen eine lokalisierte Lymphadenopathie folgen kann ^{180,195,200}. Bei ungefähr der Hälfte der Patienten treten zu den genannten Symptomen zusätzlich Fieber, Kopfschmerzen und Unwohlsein auf, weiterhin kann es zu Übelkeit, Gewichtsverlust, Halsschmerzen und Splenomegalie kommen. Schwerwiegendere Komplikationen manifestieren sich in ca. 10 % der Fälle. Die häufigste stellt mit 6 % der Fälle das Perinaud'sche okuloglanduläre Syndrom dar, gefolgt von Enzephalitis, zerebraler Arteriitis, Radikulitis, Myelitis, granulomatöser Hepatitis oder Splenitis ^{21,63,96,113,114,160,195}. In der aus Lymphknoten entnommenen Histologie präsentiert sich die CSD als eine nekrotisierende, granulomatöse Entzündungsreaktion mit lymphatischen Infiltraten und mehrkernigen Riesenzellen ^{3,119,180}.

1.1.3.2 Bazilläre Angiomatose (BA)

Im Gegensatz zur CSD sind von der BA in erster Linie Immunsupprimierte - v.a. HIV-positive Patienten - betroffen. 1983 konnte die Krankheit erstmals bei AIDS-Kranken beschrieben werden^{32,173} und gilt nach dem U.S. Center for Disease Control and Prevention als AIDS definierende Krankheit. In Ausnahmefällen können auch Immunkompetente an BA erkranken^{31,98,140}. Der 1989 von LeBoit gewählte Name ‚Bazilläre Angiomatose‘ beschreibt treffend die Pathogenese (infektiös, bakteriell) und die Histologie (Angiomatose) dieser vaskuloproliferativen Krankheit¹⁰⁴. Sowohl *B. henselae* als auch *B. quintana* konnten als Erreger der BA nachgewiesen werden⁹⁷. Die Erkrankung präsentiert sich klinisch als einzeln oder multipel auftretende, kutane oder subkutane Läsionen mit derbem rötlich-lividem Aussehen, die dem Kaposi Sarkom morphologisch ähneln können (s. **Abb. 1**).

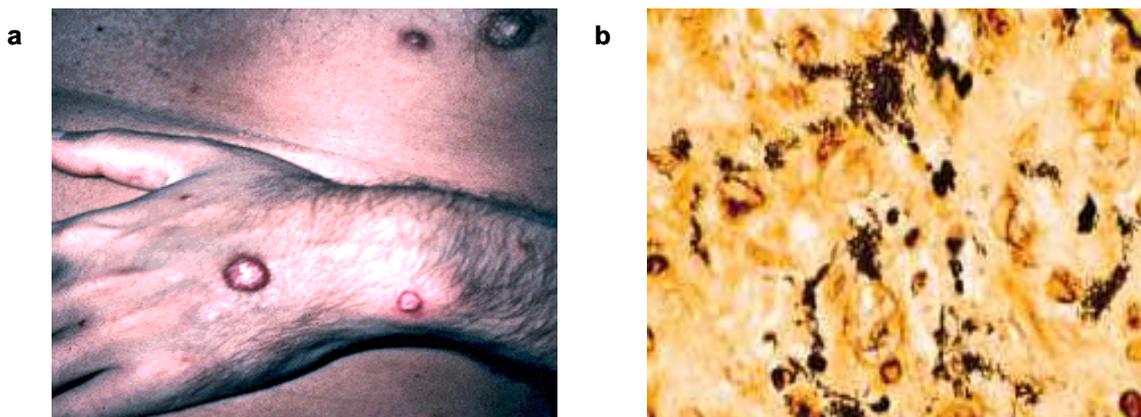


Abb. 1: Makroskopischer und mikroskopischer Befund bei BA.

a) Erythematöse Papel bei einem Patienten mit BA (http://edcenter.med.cornell.edu/Pathophysiology_Cases/HIV/Cutaneous_Manifestations/4976.gif).

b) Eine oberflächliche Hautläsion (Warthin-Starry Färbung) bei einem Patienten mit BA zeigt eine große Anzahl versilberter Erreger (<http://www.hospract.com/issues/1998/12/celout.htm>).

Charakteristisch sind lobuläre, kapilläre Gefäßproliferationen epitheloider, teilweise atypischer Endothelzellen, die Blutgefäße auskleiden und teilweise ins Lumen hineinragen. Entzündliche Infiltrate, die Bakterien, neutrophile Granulozyten und leukozytoklastischen Debris enthalten, wurden ebenfalls in den meisten Fällen gefunden¹. Viszerale Manifestationen der BA

(z.B. PH, s. **Kap. 1.1.3.3**) konnten schon in den verschiedensten Organsystemen beobachtet werden ¹⁸⁷.

1.1.3.3 Peliosis hepatis (PH)

Die PH ist eine seltene vaskuloproliferative Hepatopathie, die - wie die BA - vorwiegend bei HIV-Infizierten in Erscheinung tritt. Charakteristisch für die PH sind dilatierte Lebersinusoiden und zystisch-gekammerte, blutgefüllte Endothelzell-Proliferationen, die von myxoidem Stroma umgeben sind ^{96,160}. Im klinischen Bild imponieren Fieber, Abdominalschmerzen, Gewichtsverlust und Hepatomegalie ¹²⁶. Bevor *B. henselae* als eine der Ursachen der PH bei HIV-Infizierten identifiziert werden konnte, wurde sie schon bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden oder nach Anabolikaeinnahme beschrieben ^{133,187}.

1.1.4 Epidemiologie

Zahlreiche Publikationen über die Prävalenz von humanen Infektionen mit *Bartonella* spp. geben an, dass bei 6 – 30 % der Population in Europa *Bartonella*-spezifische Antikörper nachweisbar sind; in einzelnen Regionen der USA liegt sie sogar bei 50 % ^{40,66}. In 30 % der kultur-negativen Halslymphknotenschwellungen scheint *Bartonella* spp. das ätiologische Agens zu sein ¹⁴⁵.

80 % der CSD-Erkrankungen treten bei Kindern mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen 2 bis 14 Jahren auf; von diesen hatten mehr als 90 % vor Ausbruch der Erkrankung Kontakt zu Katzen angegeben. Bei den Patienten mit BA lag der Prozentsatz der Personen, die Kontakt zu Katzen hatten, bei nur 20 % ²⁰⁰. In Studien wurden regionale Unterschiede im Vorkommen der Häufigkeit von *Bartonella* spp. bei Katzen ausgemacht. So sind in der Gegend um San Francisco ca. 41 % der Hauskatzen für *B. henselae* seropositiv, während in der Freiburger Region von einer Seroprävalenz von 13 % ausgegangen wird ¹⁵⁶. Über die Rolle von Flöhen als mögliche Vektoren bei der Übertragung von *B. henselae* wurde schon frühzeitig spekuliert. Es wird angenommen, dass die Fäzes oder das bei einer Flohmahlzeit ausgetauschte infizierte Blut das

Inokulum darstellt, mit dem *B. henselae* zwischen den Katzen oder aber auch von der Katze zum Menschen wechselt ⁷⁰.

Von 24 000 geschätzten Fällen an CSD wird jährlich in den USA berichtet; von diesen müssen 2 000 ins Krankenhaus eingewiesen werden ⁷⁹.

1.1.5 Diagnose und Therapie

Bei Infektionen mit *B. henselae* ist der indirekte Immunfluoreszenztest zum serologischen Nachweis von Antikörpern das Diagnostikum der ersten Wahl. Bei Patienten mit CSD konnten in 80 % der Fälle Antikörper gegen *B. henselae* festgestellt werden, während in der Kontrollgruppe nur 3 % (Titer > 1:256) positiv waren ¹³⁹. Auch kann aus frischen oder formalinfixierten Gewebebiopsien ein DNA-Nachweis des Erregers mittels PCR-Amplifikation und anschließender Hybridisierung oder 16S rRNA-Sequenzierung versucht werden ^{2,44,119}. Bei Verdacht auf BA erfolgt die Diagnostik primär aus Biopsaten entsprechender Hautläsionen, wobei die kulturelle Anzucht des Erregers zeitaufwendig und schwierig ist. Die Erregeranzucht in der Zellkultur ist die erfolgsversprechendste Methode; aber auch sie ist langwierig und anspruchsvoll ¹⁵.

Bei der komplikationslos verlaufenden CSD genügt in der Regel eine konservative symptomatische Therapie. Der Einsatz von Antibiotika ist meist nur bei Auftreten von Komplikationen indiziert. Hierbei erzielt Azithromycin - für fünf Tage oral verabreicht - die besten Resultate.

Als Mittel der ersten Wahl zur Therapie der BA gelten Clarithromycin und Azithromycin. Alternativ kommen auch Erythromycin, Doxycyclin sowie Ciprofloxacin in Frage ¹⁵³. Meist ist eine orale Therapie mit Erythromycin oder einem neueren Makrolid für die Dauer von drei Wochen ausreichend. Bei Rückfällen oder bei Immunsupprimierten kann allerdings eine längere Antibiotikagabe erforderlich sein ⁸. Bei der Wahl des Antibiotikums ist das Erreichen einer intrazellulären Wirkstoffkonzentration, wie es bei Makroliden oder Doxycyclin der Fall ist, entscheidend.

1.1.6 Pathogenese von *Bartonella*-Infektionen

Wie sich in vielen Fallstudien herausstellte, treten die schwerwiegendsten Manifestationen der durch *Bartonella* spp. hervorgerufenen Erkrankungen bei geschwächter zellulärer Immunität auf ^{19,96,173,202}. Insbesondere bei immunsupprimierten HIV-Patienten wurden persistierende Bakteriämien mit *B. henselae* beobachtet ^{19,137,168}. Dass vor allem Patienten mit eingeschränkter zellulärer Immunität von schwerwiegenden Infektionen mit *B. henselae* betroffen waren, führte zu der Hypothese, dass die Erreger intrazellulär persistieren könnten. Die Tatsachen, dass erstens nur Antibiotika wirksam waren, die ein gutes Penetrationsvermögen in die Zelle aufwiesen, zweitens die Infektionen die Tendenz hatten zu rezidivieren und drittens im Vergleich zum konventionellen Ausplattieren größere Keimzahlen aus Blutkulturen durch Verwendung eines Lysezentrifugationssystems erreicht werden konnten ¹⁴, bestärkten diese Hypothese.

Damit es überhaupt zu einer intrazellulären Persistenz des Erregers kommen kann, hat *B. henselae* einige Mechanismen entwickelt, um in die Wirtszelle eindringen zu können. Möglicherweise spielen Oberflächenmembranproteine (*outer membran protein*, OMP) bei der Adhärenz an der Wirtszelle eine entscheidende Rolle. Von den Oberflächenmembranproteinen sind bislang neun mit einer Größe von 28 - 171 kDa identifiziert worden, wobei das 43 kDa OMP den Kontakt zur Endothelzelle zu vermitteln scheint ¹⁷.

Neben den Oberflächenmembranproteinen ist als weiterer Pathogenitätsfaktor die Pilusexpression (‚Typ IV-like-Pilus‘) von *B. henselae* zur Adhäsion und Penetration in die Wirtszelle von Bedeutung. Es wurde beobachtet, dass durch lange Passagezeiten die Pilusexpression von *B. henselae* vermindert bis vollständig unterbunden werden konnte und dass diese Spontanvarianten eine deutlich geringere Adhäsion und Penetration zur Wirtszelle aufwiesen ⁶.

Durch Transposon-Mutagenese wurde von *B. henselae* ein Klon hergestellt, bei dem sich herausstellte, dass ihm die Fähigkeit zur Bindung an Fibronectin (Fn) verloren gegangen war ¹⁴⁶. Bei der nachfolgenden Sequenzierung der Insertionsstelle der Fn-bindungsdefizienten Mutante zeigte sich eine hohe Homologie von 72 % zur Hals-Region von dem Adhäsionsmolekül von

Y. enterocolitica, YadA (*Y. enterocolitica* Adhäsins A). Das gesamte Gen wurde als ein hochrepetitives 9,3 kb großes Molekül charakterisiert, das eindeutig der Klasse der nicht-fimbriellen Adhäsionsmoleküle zuzuordnen ist ⁷². Analog zu dem Adhäsionsmolekül von *Y. enterocolitica* wurde es demzufolge *Bartonella* Adhäsins A (BadA) genannt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Transposon-Mutante keine Expression des Oberflächenmoleküls mehr aufwies und in ihrer Eigenschaft an Endothelzellen zu binden deutlich abgeschwächt war ¹⁴⁶. BadA scheint maßgeblich an der Interaktion des Bakteriums mit der Wirtszelle beteiligt zu sein und scheint auf diese Weise eine bedeutende Rolle bei der Auslösung einer proangiogenetischen Wirtszellantwort zu spielen. Untersuchungen der Arbeitsgruppe legen den Schluss nahe, dass es sich bei BadA um den ‚Typ IV-like-Pilus‘ von *B. henselae* handelt ¹⁴⁶.

B. henselae verfügt über mindestens ein Typ IV-Sekretionssystem, das hohe Homologien zu dem Sekretionssystem von dem phytopathogenen *Agrobacterium tumefaciens*, dem Erreger der Wurzelhalsgalle, aufweist. Das Typ IV-Sekretionssystem, das evolutionär eng mit dem Konjugationssystem gramnegativer Bakterien verwandt ist, besteht aus einem Pilus, der mit einem durch die innere und äußere Bakterienmembran verlaufenden Proteinkanal verbunden ist. Neben Proteinen zählen auch DNA oder DNA-Proteinkomplexe zu den Effektormolekülen dieses Kanals. Welche Rolle das Typ IV-Sekretionssystem bei Infektionen mit *B. henselae* spielt ist noch nicht geklärt. Bislang konnte einzig nachgewiesen werden, dass die Interaktion des Bakteriums mit Endothelzellen in einer Aktivierung dieses Systems resultiert ¹⁵⁸.

1.2 Angiogenese

Blutgefäße entwickeln sich zu dem ersten Organsystem im Embryo und bilden das weitverzweigteste Netzwerk in unserem Körper. Allzu oft sind sie aber auch Ausgangspunkt tödlich verlaufender Krankheiten. Wenn Gefäßwachstum fehlreguliert wird, kann sich das in einer Vielzahl von neoplastischen, ischämischen, inflammatorischen, infektiösen und immunologischen Störungen äußern.

Blutgefäße können sich auf ganz unterschiedliche Weise entwickeln. Der Begriff Vaskulogenese bezieht sich auf die Neubildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen im Embryo. Angiogenese und Arteriogenese beziehen sich auf die Sprossung aus bereits existierenden Gefäßen. Die physiologische Angiogenese tritt beim ausgewachsenen Menschen nur noch beim Aufbau der Uterusschleimhaut und bei der Wundheilung in Folge von Verletzungen auf ¹⁰⁵.

Demgegenüber ist die pathologische Angiogenese durch eine lange Liste von Störungen - hervorgerufen durch exzessives Gefäßwachstum – charakterisiert. Zu den am besten bekannten und erforschten zählen die soliden Neoplasien, die Psoriasis, die diabetische Retinopathie und die Arthritis ^{24,56,57,148}.

Unzureichendes Gefäßwachstum und anormale Gefäßrückbildung manifestiert sich nicht nur als ischämische Störung (z.B. des Herzens oder des Gehirns), sondern kann auch zu Neurodegeneration, Hypertonie, Präeklampsie, respiratorischen Störungen, Osteoporose und anderen Krankheitsbildern führen ^{11,38,115,121}.

Das unreife Gefäßbett expandiert durch Sprossung und reift zu einem System stabiler Gefäße. Die Hypoxie stellt dabei einen entscheidenden Stimulus für die Expansion des Gefäßbettes dar. Ursprünglich werden Zellen durch einfache Diffusion mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen versorgt. Überschreitet das Gewebe die Grenze des Diffusionsvermögens des Sauerstoffs, leitet Hypoxie über die Aktivierung von Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (*hypoxia-inducible factor*, HIF) und angioproliferativ wirkenden Genen neues Gefäßwachstum ein ¹³⁴. HIFs induzieren eine große Anzahl

proangiogenetischer Gene, von denen das Gen für VEGF (*vascular endothelial growth factor*) das bedeutendste darstellt²³.

Bei Stimulation müssen Endothelzellen fähig sein, aus ihren gereiften Strukturen auszutreten und durch koordinierte Sprossung neues Gefäßwachstum zu ermöglichen. Nachdem der Kontakt der Endothelzelle zu der umgebenden extrazellulären Matrix durch Proteinasen gelöst wurde²⁵, sind die Endothelzellen in der Lage, an einem provisorisch angelegten Gerüst - bestehend aus einer Matrix aus Fibronectin, Fibrin und anderen Komponenten - in das umgebende Gewebe einzuwandern^{73,75}. Ist die Sprossung erst einmal vollzogen, müssen die Endothelzellen wieder stabilisiert werden, um zu einem funktionellen, standhaften Netzwerk reifen zu können. Die Bindung von Perizyten und glatten Muskelzellen an ausgewanderte Endothelzellen beeinflusst die Proliferation, die Differenzierung, den Blutstrom und die Ernährung neugebildeter Gefäße^{58,80}.

Eine bakterielle Induktion der Angiogenese ist bislang einzig für die Gattung *Bartonella* bekannt. Die durch *B. henselae* und *B. quintana* hervorgerufenen Gefäßproliferationen resultieren in dem typischen Bild der BA (s. **Kap. 1.1.3.2**). Auch für andere Vertreter der Gattung *Bartonella* sind angioproliferative Krankheitsbilder beschrieben worden, wie z.B. für die durch *B. bacilliformis* verursachten Verruga peruana (s. **Kap. 1.1.1**). Daneben sind als erregerbedingte Ursachen pathologischer Angiomatose das Humane Herpes Virus-8 (HHV-8)¹¹⁶ und das Orf-Virus¹²² bekannt. HHV-8 wird bei HIV-positiven Patienten mit der Entstehung des Kaposi Sarkoms assoziiert, einer opportunistischen Erkrankung mit exzessiver Proliferation von Spindelzellen, von denen vermutet wird, dass sie vaskulären Ursprungs sind. Das Orf-Virus ist ein weltweit verbreitetes, epitheliotropes Parapocken-Virus, das Hautläsionen in Schafen, Ziegen und Menschen hervorruft. Diese Läsionen zeichnen sich histopathologisch durch massive Proliferation und Dilatation von Kapillaren aus. Ein neues Mitglied der VEGF-Familie mit angioproliferativer Aktivität, das VEGF-E, konnte erst kürzlich im Genom des Orf-Virus identifiziert werden¹²².

1.2.1 Proangiogenetisch wirksame Zytokine

Zytokine stellen eine uneinheitliche Gruppe löslicher Proteine und Peptide von kurzer Halbwertszeit dar, die von den unterschiedlichsten Zellen gebildet und sezerniert werden können. Zytokine dienen als interzelluläre Mediatoren zur Kommunikation der Zellen untereinander. In äußerst geringen Konzentrationen im nano- oder pikomolaren Bereich modulieren sie in auto- oder parakriner Weise die Aktivität einzelner Zellen oder aber auch ganzer Zellverbände⁷⁶. Zuerst wurde ihre Wirkung im Rahmen der Hämatopoese und des Immunsystems analysiert, wobei sie drei grundlegende Stoffwechselforgänge der Zelle steuern: Wachstum, Differenzierung und Aktivierung. Neben der Chemotaxis wird auch der programmierte Zelltod, die Apoptose, durch Zytokine eingeleitet und kontrolliert. Neben der parakrinen Wirkung modulieren sie aber auch systemische Reaktionen wie Fieber oder sind an dem Geschehen des septischen Schocks beteiligt^{20,49}.

1.2.2 Das Zytokin *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

VEGF ist der Schlüsselregulator physiologischer Angiogenese^{23,53}. Auch bei der pathologischen Angiogenese, die in Neoplasien, proliferativen Retinopathien und anderen Störungen resultieren kann, wird VEGF eine führende Rolle zugeschrieben⁵².

Der Prototyp der VEGF-Familie, das VEGF-A, gehört zu einer Genfamilie, der außerdem noch der *placental growth factor* (PLGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E angehören. VEGF-A ist der Schlüsselregulator des Blutgefäßwachstums, während VEGF-C und VEGF-D das Lymphgefäßwachstum regulieren⁸⁶.

Als ein überlebenswichtiger Faktor für Endothelzellen vermag VEGF sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Endothelzellen zum Wachstum anzuregen^{7,52,107}. Neben seinem wachstumsinduzierenden Stimulus besitzt VEGF die Fähigkeit den Kontakt zwischen Endothelzellen zu lockern und somit die Gefäße permeabler zu machen^{45,165}. Dank dieser permeabilitätssteigernden Wirkung kommt dem Zytokin bei entzündlichem Geschehen und anderen pathologischen Umständen Bedeutung zu. Zusätzlich induziert VEGF die endotheliale

Fenestrierung in bestimmten Gefäßsystemen¹⁴⁹ und führt in einer dosisabhängigen Weise zu einer Vasodilatation durch Stimulation der NO-Synthase in Endothelzellen¹⁰¹

1.2.2.1 Regulation der VEGF-Induktion

Die Sauerstoffsättigung im Gewebe spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Expression einer Vielzahl von Genen. Auch die Bildung von VEGF-mRNA wird durch einen Abfall der Sauerstoffkonzentration im Gewebe induziert⁴². Es wurde gezeigt, dass HIF-1 den entscheidenden Transkriptionsfaktor der Zellantwort auf hypoxische Zustände darstellt (s. **Kap. 1.2.5**)¹⁶³. Verschiedene wichtige Wachstumsfaktoren wie z.B. *epidermal growth factor*, *keratinocyte growth factor*, *insulin-like growth factor-1*, *fibroblast growth factor* und *platelet-derived growth factor* führen ebenfalls zu einer Induktion der VEGF-mRNA¹²⁷. Die Tatsache, dass inflammatorische Zytokine wie IL-1 α und IL-6 die Expression von VEGF in verschiedenen Zellen induzieren, befindet sich im Einklang mit der Hypothese, dass VEGF ein Mediator der Angiogenese und der Gefäßpermeabilität bei entzündlichem Geschehen ist¹²⁷.

1.2.3 Das Zytokin Interleukin-8 (IL-8)

Das zur Gruppe der Interleukine gehörende IL-8 ist ein klassisches Chemotaxin und ein Modulator des Immunsystems⁸³. Das v.a. von Monozyten-Makrophagen gebildete Zytokin wirkt selektiv chemotaktisch auf Neutrophile und Lymphozyten¹²⁵. Neben dieser inflammatorischen Funktion wurde erst kürzlich eine Beteiligung dieses Zytokins an der Angiogenese festgestellt¹⁷⁴. Als ein Charakteristikum vieler angiogenetisch wirksamer Zytokine, wie z.B. VEGF, aFGF und bFGF (*acidic* und *basic fibroblast growth factor*), bindet IL-8 ebenfalls an Heparin. Experimente zeigten, dass humanes rekombinantes IL-8 als ein proliferativer und chemotaktischer Stimulus auf HUVECs (*human umbilical vene endothelial cell*) wirkt⁹⁵ und dass in einer avaskulären Cornea von Ratten die *in vivo* Stimulation mit IL-8 in einer angiogenetischen Antwort resultierte^{41,92,174}. Im Gegensatz zu VEGF wird die Expression von IL-8 nicht von dem Transkriptionsfaktor HIF-1 sondern von

NF- κ B kontrolliert. Dessen Signalweg scheint auch von Hypoxie, dem entscheidenden Stimulus der Angiogenese, beeinflusst zu sein ⁹⁹.

1.2.4 Die Zytokine Adrenomedullin (ADM) und *Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3* (IGFBP-3)

Humanes ADM ist ein 52 Aminosäuren großes Peptid, das an der Regulation einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt ist. Es besitzt starke vasodilatatorische Effekte ⁹⁴, hemmt die Apoptose von vaskulären Endothelzellen und agiert als ein antiproliferativer Faktor von glatten Muskelzellen ^{84,87}. In Tumorzellen, bei Entzündungen und unter Hypoxie stellte man eine erhöhte Expression von ADM fest, die in Tumorzellen mit einer Neovaskularisation assoziiert war ³⁴. So ist bekannt, dass ADM eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese, der Gefäßentwicklung sowie bei der Angiogenese der weiblichen Fortpflanzungsorgane spielt ^{26,129}.

Die *insulin-like growth factors* (IGF) sind wichtige Faktoren der Regulation von Wachstum und Zellproliferation. Ihre Aktivität wird von den IGFBPs moduliert, die auch von den IGFs unabhängige Funktionen wie z.B. Hemmung des Zellwachstums oder Induktion der Apoptose haben ¹⁴⁴. Auf eine mögliche Rolle von IGFBP-3 an der Angiogenese deuten Experimente hin, in denen nachgewiesen werden konnte, dass in proliferierenden Endothelzellen eines Mammakarzinoms der Maus eine vermehrte Expression von IGFBP-3 stattfindet ¹⁵⁷.

1.2.5 Der Transkriptionsfaktor *Hypoxia-Inducible Factor-1* (HIF-1)

HIF-1 ist ein $\alpha\beta$ -Heterodimer, das zuerst als Mediator der Hypoxie-induzierten Erythropoetin-Expression und später der Angiogenese entdeckt wurde ^{161,164,182,188}. Während die HIF-1 β -Untereinheit ein konstitutiv exprimiertes nukleäres Protein ist, ist die HIF-1 α -Untereinheit durch Hypoxie induzierbar und stellt somit den kontrollierenden Faktor dar. Wie Studien zeigen konnten, ist der HIF-1 α -Spiegel unter physiologisch normoxischen Bedingungen generell auf einem sehr niedrigen Niveau, selbst in physiologisch hypoxischen Regionen (wie z.B. dem Nierenmark) kann er noch unterhalb der Nachweisgrenze

liegen¹⁵⁰. Bei systemischer Hypoxie sowie bei Ischämie des Gewebes wird der HIF-1 α -Spiegel substantiell erhöht, wobei das Ausmaß und der Zeitverlauf innerhalb der verschiedenen Gewebearten unterschiedlich ausfallen kann^{106,175,190}. Ist es einmal zur Akkumulation der HIF-1 α -Untereinheit in der Zelle gekommen, erfolgt zusammen mit der stets in hohem Maße exprimierten HIF-1 β -Untereinheit der Zusammenschluss zum funktionellen Transkriptionsfaktor. Dieser bindet dann an die Erkennungssequenzen für HIF im Genom, den *hypoxia response elements* (HRE). Von den u.a. aus der konservierten Sequenz ACGTG bestehenden HREs wird vermutet, dass sie durch konstitutive Faktoren wie z.B. dem *activating transcription factor* (ATF) oder dem *cAMP response element binding protein* (CREB) unter Abwesenheit von HIF-1 besetzt gehalten werden, um eine Methylierung zu verhindern^{78,123,155}.

Zusammenfassend kann man über die Funktion der durch HIF induzierten Gene sagen, dass sie das Überleben der Zelle unter hypoxischen Bedingungen kurzfristig und langfristig sicherstellen. Zum einen erleichtert HIF-1 den Zellen die Bewältigung eines kurzfristigen Sauerstoffmangels mittels anaerober Energiegewinnung durch die Aktivierung von Genen der Glykolyse; des Weiteren wird über die Induktion von Erythropoetin die Erythropoese stimuliert, was in Folge länger andauernder Hypoxie die Sauerstoffversorgung verbessert. Schlussendlich leitet HIF-1 als langfristige Antwort auf Sauerstoffmangel die Angiogenese mit Aussprossung neuer Gefäße ein¹⁶³.

Unter den drei HIF- α Isoformen sind HIF-1 α und HIF-2 α eng verwandt und sind fähig, mit den HREs zu interagieren und die Transkription angiogenetischer Gene einzuleiten^{176,192}. Im Gegensatz dazu scheint HIF-3 α in die negative Regulation der Antwort auf Hypoxie involviert zu sein¹³¹.

HIF- α -Untereinheiten werden durch einen vielschichtigen Prozess reguliert, der Änderungen der Aktivität, des mRNA-Splittings und der Lokalisation beinhaltet (s. **Abb. 2**)¹⁸⁸. Hydroxylierung an zwei Prolyl-Resten vermittelt die Interaktion mit dem von Hippel-Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase Komplex, der HIF-1 α für die proteasomale Degradation markiert^{77,78,201}. Dieser Schritt, der zu einer extrem schnellen Proteolyse von HIF-1 α in oxygenierten Zellen führt, wird durch

drei erst neulich beschriebene HIF Prolyl Hydroxylasen 1-3 vermittelt^{16,50}. In einem zweiten regulierenden Schritt resultiert die β -Hydroxylierung eines Asparagin-Restes von HIF-1 α durch die HIF Asparaginyl Hydroxylase (*factor inhibiting HIF*, FIH) in einer Blockierung der Interaktion von HIF-1 α mit dem Co-Aktivator der Transkription p300; dies führt zu einer Verminderung der Transkriptionsaktivität von HIF-1 α ^{69,103,110}.

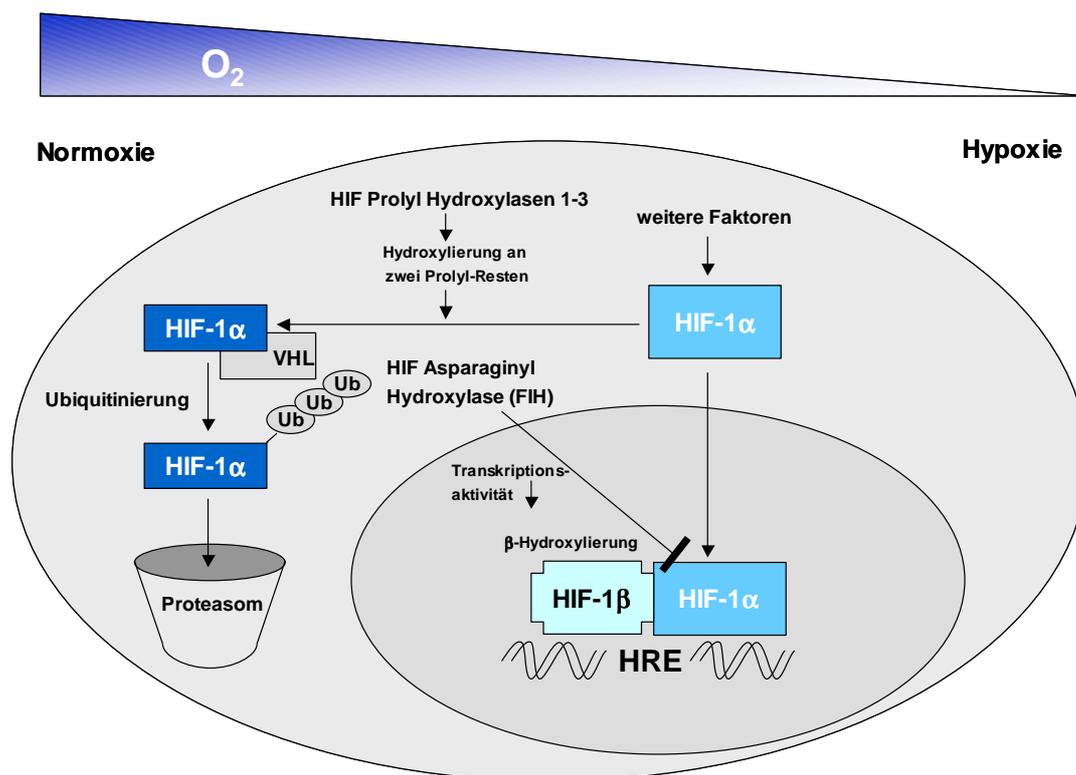


Abb. 2: Modell der Aktivierung und Degradation von HIF-1 α unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen.

Mittels Interaktion mit dem von Hippel-Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase Komplex wird HIF-1 α bei Normoxie durch die HIF Prolyl Hydroxylasen 1-3 dem Proteasom zugeführt. Bei physiologischen Bedingungen reduziert die HIF Asparaginyl Hydroxylase die Transkriptionsaktivität von HIF-1 α . Besteht Hypoxie, wird HIF-1 α in den Zellkern transloziert und kann nach Interaktion mit HIF-1 β an das HRE binden und somit die Transkription von angiogenetischen Genen einleiten. FIH: *factor inhibiting HIF*, HIF: *hypoxia-inducible factor*, HRE: *hypoxia response element*, Ub: Ubiquitin, VHL: von Hippel-Lindau-Protein.

In oxygenierten Zellen gewährleisten diese beiden Hydroxylierungsreaktionen einen dualen Mechanismus der HIF-Inaktivierung, bestehend aus proteolytischer Zerstörung und Verminderung der Transkriptionsaktivität. Die HIF-Hydroxylasen sind alle Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen, die, um ihre Aktivität entfalten zu können, essentiell auf molekularen Sauerstoff angewiesen sind. Besteht dagegen Sauerstoffmangel, ist es HIF möglich, den Hydroxylasen und somit seiner Inaktivierung zu entgehen. Zusammengenommen zeigen diese Erkenntnisse die Verkettung der angiogenetischen Antwort auf metabolische Bedürfnisse mit Hilfe eines nur minimalen Signalwegs, der die Verfügbarkeit molekularen Sauerstoffs, die Aktivität der HIF-Hydroxylasen, die HIF-abhängige Transkription und die Sekretion von angiogenetischen Wachstumsfaktoren verknüpft.

Zusätzlich zu der Aktivierung durch Hypoxie wird das HIF-System durch ein großes Spektrum an Wachstum induzierenden Stimuli wie z.B. Insulin, *insulin-like growth factor-1*, *epidermal growth factor* sowie durch onkogenetisch veränderte Signalwege (z.B. Ras und Src Kinase) induziert oder zumindest verstärkt. Mutationen von Tumor Suppressor Genen - wie z.B. dem p53, wohl aber am eindrücklichsten von dem pVHL - aktivieren ebenfalls das HIF-System^{120,162,188}. Neben diesen pathologischen Einflüssen auf das HIF-System wird auch dem MAP-Kinase-Signalweg eine modulierende Funktion auf dieses System zugeschrieben¹⁴².

1.2.6 Die Rolle der *Mitogen-Activated Protein (MAP)*-Kinasen in der Angiogenese

MAP-Kinasen stehen an letzter Stelle einer hierarchisch strukturierten Kaskade von Protein-Kinasen, die mittels Protein-Phosphorylierung Signale von der Zelloberfläche zum Zellkern fortleiten, wo sie die Transkription bestimmter Gene durch Aktivierung ihrer Transkriptionsfaktoren induzieren^{71,85}. MAP-Kinasen werden hauptsächlich durch zwei Merkmale ausgezeichnet. Zum einen werden sie durch zweifache Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten aktiviert, zum anderen sind sie Prolin-geleitete Serin/Threonin Kinasen mit einer minimalen Zielsequenz von Serin/Threonin-Prolin^{36,37,184}. Drei unterschiedliche

Signalwege, die allesamt in einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 münden, konnten bislang in Säugetierzellen identifiziert werden^{36,37,184}.

Der zur Zeit am besten untersuchte MAP-Kinase Signalweg führt zur Aktivierung der zur ERK-Familie gehörenden Mitglieder ERK 1 und ERK 2, die auch unter den Namen p44 bzw. p42 bekannt sind. Neben der Möglichkeit der Phosphorylierung von zytoplasmatischen Proteinen können aktivierte p42/p44 MAP-Kinasen auch in den Kern transloziert werden, wo sie wiederum mittels Phosphorylierung zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren fähig sind^{61,62,81,112}. Während die Aktivierung von JNK und p38 MAP-Kinase für die Einleitung von Apoptose eine wichtige Rolle zu spielen scheint, wird der selektiven Aktivierung des p42/p44 MAP-Kinase Signalweges neben einer hemmenden Funktion auf p38 und JNK eine Apoptose-inhibierende Rolle zugeschrieben¹⁹⁸. Die Aktivierung von p42/p44 MAP-Kinasen durch klassische vasoproliferative Mitogene wie z.B. VEGF oder *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) spielt auch eine zentrale Rolle in der Kontrolle des Wachstums von Endothelzellen^{100,151,170}. In Studien konnte auch der umgekehrte Fall gezeigt werden, dass nämlich p42/p44 über unterschiedliche Mechanismen die VEGF-Expression induziert. Nach Aktivierung von p42/p44 kommt es zu einer über eine Interaktion mit der proximalen Region des VEGF-Promotors zur vermehrten Expression des Zytokins, zum anderen bewirkt eine direkte Phosphorylierung des VEGF regulierenden Transkriptionsfaktors HIF-1 α eine gesteigerte Transkriptionsaktivität⁹. Durch Hemmung der übergeordneten MAPK-Kinase durch den MEK1 (MAP/ERK Kinase)-Inhibitor PD 98059 wurde die Phosphorylierung und somit die Transkriptionsaktivität von HIF-1 α herabgesetzt¹⁴². In weiteren Studien wurde außerdem gezeigt, dass Hypoxie zu einer Phosphorylierung von p42/p44 und zu einer Translokation der MAP-Kinase in den Zellkern führte, wo die Phosphorylierung von HIF-1 α stattfand¹²⁴.

Die p38 MAP-Kinase soll neben der aktivierenden Wirkung auf diverse Transkriptionsfaktoren, der Steigerung der mRNA-Stabilität und der Reorganisation des Zytoskeletts¹⁸⁹ zu einer Erleichterung der

NF- κ B-vermittelten Transkription von IL-8 durch Phosphorylierung und Phosphoazetylierung des Histons H3 beitragen¹⁵⁴. Einen weiteren Hinweis auf die mögliche Beteiligung von p38 liefert das mit dem Kaposi Sarkom assoziierte HHV-8, das über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor und anschließender Aktivierung von p38 die HIF-1 vermittelte VEGF-Sekretion anregt^{5,169}.

1.2.7 Induktion eines proangiogenetischen Genmusters durch *B. henselae*

Wie in vorangehenden Experimenten gezeigt werden konnte, ruft die Infektion von HeLa-Zellen mit *B. henselae* ein bestimmtes Genmuster in der Wirtszelle hervor⁹¹. In **Tab. 1** (s. Anhang) sind all diejenigen Gene aufgelistet, die im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit einer mehr als zweifachen Induktion gemessen werden konnten. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, lassen sich die Gene in vier verschiedene funktionelle Gruppen einteilen:

- vaskuloproliferative Wirkung
- Glykolyse
- Signaltransduktion
- Gene unbekannter Funktion

Von den insgesamt 20 induzierten Genen unterliegen 14 Gene der direkten bzw. indirekten Regulation des Transkriptionsfaktors HIF-1^{134,163}. Eine Ausnahme bildet das Zytokin IL-8, das durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert wird⁸².

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel vorliegender Arbeit war es, die von *B. henselae* induzierte proangiogenetische Wirtszellantwort auf zell- und molekularbiologischer Ebene zu analysieren.

Der erste Schritt bestand darin, ausgewählte Daten zur Geninduktion nach *B. henselae*-Infektion aus Gene-chip Experimenten auf Proteinebene (VEGF, IL-8, ADM, IGFBP-3) zu verifizieren. Die Untersuchung der Aktivierung von HIF-1 als Reaktion auf eine Infektion mit *B. henselae* stellte eine weitere

Aufgabe der vorliegenden Arbeit dar. Die HIF-1-Aktivierung wurde ebenfalls nach Infektion mit verschiedenen anderen Bakterien analysiert. Des Weiteren wurde die Rolle der MAP-Kinasen p38 und p42/p44 an der *B. henselae* induzierten VEGF- und IL-8-Sekretion charakterisiert. Schließlich wurde die Abhängigkeit der proangiogenetischen Wirtszellantwort von der Expression des Oberflächenproteins BadA nach *B. henselae*-Infektion untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten einen Beitrag leisten, anhand des *B. henselae* *in vitro*-Infektionsmodells bakterielle Infektionen und proangiogenetische Wirtszellantwort funktionell miteinander zu verbinden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Anaerobiertopf	E. Merck, Darmstadt
Anaerobierbeutel	Oxoid, Hampshire, GB
Analysenwaage BP610, PT1200	Sartorius, Göttingen
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer (Columbus Washer)	Tecan
Filmentwickler CURIX 60	AGFA, Leverkusen
Konfokales Laserscan-Mikroskop (CLSM)	Leica, Bensheim
Leica DM IRE 2	
Software: Photoshop 6.0	Adobe Systems, Mountain View, USA
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope	Carl Zeiss, Jena
Multistepper	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Superior, Lauda-Königshofen
Pipettier-Hilfe	Eppendorf
Rotations-Schüttler	Heidolph, Schwabach
Schüttelinkubatoren	Infors AG, Bottmingen
SDS-PAGE-Kammern (Protean II; Mini Protean)	Bio-Rad, München
Spannungsquellen für Elektrophorese	Bio-Rad
Spektralphotometer (Ultrospec 3000)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Steril-Arbeitsbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Thermo-Schüttler	Eppendorf

Ultra-Turrax T8	Ika-Werke, Staufen
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifugen:	
Eppendorf 5317R	Eppendorf
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Biofuge Stratus	Heraeus
Sorvall RC 5C Plus	Sorvall, Hamburg
MiniSpin plus	Eppendorf

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

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

Autoradiographie-Filme (Kodak X-OMAT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Einmalküvetten	Sarstedt, Berlin
ELISA-Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Mikrotiter-Platten (Spitzboden, Rundboden)	Greiner, Nürtingen
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Falcon/Becton-Dickinson
Pipettenspitzen (10 µl)	Gilson, WI, USA
Pipettenspitzen (200 µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (1000 µl)	Sarstedt
Plastik-Petrischalen	Greiner
PVDF-Membran	Millipore, Bedford
Rundboden-Röhrchen (13 ml)	Greiner
Spitzboden-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon/Becton-Dickinson
Whatman Filterpapier	Millipore

Zellkulturflaschen (25, 80, 175 cm ²)	Nunc
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96 - well)	Nunc

2.1.3 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	E. Merck
Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat)	E. Merck
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole-2 HCl)	E. Merck
DEPC-H ₂ O	Ambion, Huntingdon, UK
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Roth
DTT (Dithiothreitol)	Gibco BRL, Eggenstein
ECL-Western Blot Detektionssystem	Amersham Pharmacia
Entellan	E. Merck
Ethanol	E. Merck
Fluoroprep	BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerol	E. Merck
Glycin	Roth
IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid)	Roth
L-Glutamin	Gibco BRL
Methanol	E. Merck
MgCl ₂	Boehringer, Mannheim
NaCl	E. Merck
NaOH	E. Merck
PMA (Phorbol-12 Myristat-13-Acetat)	Sigma-Aldrich
PMSF (Phenylmethansulfon-Säurefluorid)	Sigma-Aldrich
PNPP (P-Nitrophenyl-Phosphat)	Sigma-Aldrich
Ponceau S Lösung	Serva, Heidelberg
SDS ultra pure (Sodium Dodecyl Sulfat)	Roth
Substanz A (Streptavidin)	Dako, Neuss

Substanz B (Biotin-alkalische Phosphatase)	Dako
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin)	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Gibco BRL
Tween 20	E. Merck
Urea	Roth

Alle weiteren Chemikalien wurden von E. Merck bezogen.

2.1.4 Antibiotika

Ampicillin	ICN Biomedicals
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Kanamycin	Sigma
Kanamycin Plättchen	Oxoid

2.1.5 Rekombinante Zytokine

Rekombinantes humanes IL-8	Pharmingen, San Diego
Rekombinantes humanes VEGF	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.6 Antikörper

Anti- β -Aktin	Chemicon
Anti-Biotin, HRP-gekoppelt	Cell Signaling
Anti-HIF-1 α	Becton-Dickinson- Biosciences
Anti-humanes-VEGF	R&D Systems
Anti-IL-8 (<i>capture/detection</i>)	Pharmingen
Sekundär-Antikörper (anti-Maus, HRP-gekoppelt)	Dako

2.1.7 Grössenstandards

Biotinylierte Protein Leiter	Cell Signaling
------------------------------	----------------

2.1.8 Medien

Die Medien für Zellkultur wurden steril angesetzt und bei + 4 °C gelagert. Das FCS wurde vor Benutzung 30 min bei 60 °C im Wasserbad inaktiviert. Für Infektionsexperimente wurden Medien ohne Antibiotika benutzt.

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

Zellkulturmedium (RPMI 1640; 10 % FCS; 1 % Gln; 1 % P/S)	500 ml RPMI 1640 5 x 10 ⁵ E Penicillin und 50 mg Streptomycin 2 mM L-Glutamin 10 % FCS
Einfriermedium	10 % DMSO 50 % FCS in RPMI 1640

Tab. 2: Übersicht über die in der Bakterienkultur eingesetzten Medien

Columbia-Agarplatten	Becton-Dickinson
Blutagarplatten	39 g Columbia-Agar (Oxoid, Hampshire, GB) wurde in 1 l H ₂ O bidest. gelöst, autoklaviert, anschließend auf 73 °C abgekühlt und 5 % defibriertes Schafsblut (Acila, Walldorf) zugegeben
Einfriermedium für Bakterien	20 % Glycerol, in LB-Medium
LB (Luria-Bertani) - Medium	5 g NaCl 5 g Bacto Hefeextrakt 10 g Bacto Trypton in 1 l H ₂ O bidest. lösen, pH 7,4-7,6

2.1.9 Bakterienstämme

Tab. 3: Bakterienstämme

<i>B. henselae</i> Marseille	(43)
<i>B. henselae</i> Pil ⁻	(90)
<i>B. henselae</i> Transposon Mutante BadA ⁻	(147)
<i>Y. enterocolitica</i> pYV ⁺ („WA-P“)	(67)
<i>Y. enterocolitica</i> pYV ⁻ („WA-C“)	(67)
<i>E. coli</i> HB 101 („ <i>E. coli</i> “)	(12)
<i>E. coli</i> HB 101 pINV 1914 („ <i>E. coli</i> inv ⁺ “)	(159)
<i>L. pneumophila</i> ATCC 33216	(10)

2.1.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Tab. 4: Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

5 x Elektrophoresepuffer	60,55 g Tris/HCl 288,15 g Glycin 100 ml 10 % SDS ad 2 l H ₂ O bidest.
5 x SDS-Probenpuffer	314 mM Tris/HCl (pH 6,8) 50 % (v/v) Glycerin 5 % (w/v) SDS 5 % 2-Mercaptoethanol 0,0025 % Bromphenolblau

2.1.11 Western blot

Tab. 5: Puffer für Western blot

Blot-Puffer	3 g Tris 14,44 g Glycin ad 1 l H ₂ O dest.
Waschpuffer	18 g NaCl 20 ml 1 M Tris pH 7,4 4 ml Tween 20 ad 2 l H ₂ O dest.
Blockpuffer	5 % Magermilchpulver gelöst in Waschpuffer

2.1.12 ELISA

2.1.12.1 VEGF-ELISA

VEGF-ELISA-kits wurden von der Firma R&D Systems, Wiesbaden bezogen.

2.1.12.2 IL-8-ELISA

Tab. 6: Übersicht über Puffer und Lösungen für IL-8-ELISA

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

2.1.13 Zelllyse-Puffer

Tab. 7: Zelllyse-Puffer für ein Endvolumen von 50 ml

Substanz	für ein Endvolumen von 50 ml	absolute Konzentration
Urea (MG 60,06)	21 g	7 mol/l
Tris-HCL pH 6,8 (1 M)	500 µl	10 mmol/l
Glycerol	5 ml	10 %
SDS	0,5 g	1 %
DTT	777 mg	5 mmol/l
PMSF	0,09 g	0,5 mmol
Protease Inhibitor Cocktail Complete™	1 Tablette	
	ad 50 ml H ₂ O dest.	

2.1.14 Sonstiges

Bacto-Agar	Difco, USA
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	Biomol, Hamburg
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	ICN Biomedicals
PBS Dulbecco	Biochrom
Protease Inhibitor Complete™	Roche
MAP-Kinase-Inhibitor SB 202190	Calbiochem, Darmstadt
MAP-Kinase-Inhibitor PD 98059	Calbiochem

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterien

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

Für die Infektionsexperimente wurde *B. henselae* Marseille benutzt. Die Bakterien wurden auf Columbia-Agar-Platten mit 5 % Schafsblut ausgestrichen und bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurden sie mit Wattestäbchen in LB-Medium geerntet, anschließend mit LB-Medium gewaschen und in Einfriermedium (LB-Medium + 20 % Glycerol) resuspendiert, aliquotiert und bei – 80 °C gelagert. Serielle Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension wurden zur Kontrolle der Bakterienzahl auf Blutagar ausplattiert und nach ca. 5 Tagen ausgezählt. Zu den Infektionsversuchen wurden die Bakterien aufgetaut, mit dem entsprechenden Medium gewaschen und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Yersinia enterocolitica pYV⁺ bzw. pYV⁻, *Escherichia coli* HB 101 und HB 101 inv⁺ wurden einen Tag vor Infektion mit einer Impföse von einer Agarplatte in 5 ml LB-Medium übertragen und über Nacht bei 27 °C (*Y. enterocolitica*) bzw. 37 °C (*E. coli*) kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Übernachtskulturen in LB-Medium 1:10 verdünnt und für weitere 2 h inkubiert, um sie in die exponentielle Wachstumsphase zu überführen. Dem LB-Medium der *Y. enterocolitica*-Kulturen wurde Nalidixin (100 µg/ml), dem Medium der *E. coli* HB 101 inv⁺-Kultur wurde Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt. Zusätzlich wurde bei *E. coli* HB 101 inv⁺ die Invasin-Expression eine halbe Stunde vor Infektion durch IPTG (1 µl/ml) induziert.

Nach Zentrifugation (3800 g, 5 min, RT) wurden die Bakterien dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der genauen Bakterienkonzentration wurde die optische Dichte bestimmt, wobei eine OD_{600nm} von 1 einer Konzentration von ~ 5 x 10⁸ Bakterien pro ml entspricht. Die zwei *E. coli*-Stämme wurden auf eine MOI (*multiplicity of infection*) von 100, die Yersinien auf eine MOI von 20 eingestellt. Die MOI wurde durch serielles Ausplattieren auf ihre Richtigkeit kontrolliert.

Legionella pneumophila wurde 2 - 3 Tage vor Infektion auf Agarplatte bei 37 °C angezüchtet und am Tage der Infektion mit Wattestäbchen in PBS geerntet. Die Einstellung der Konzentration erfolgte wie für *Y. enterocolitica* beschrieben. Für die Infektion wurde eine MOI von 100 verwendet.

2.2.1.2 Anzucht von *B. henselae* BadA⁻

In einigen Infektions-Experimenten wurde eine Tn-903-Transposon Mutante von *B. henselae* benutzt, die das bakterielle Oberflächenmolekül BadA nicht exprimiert (*B. henselae* BadA⁻). Diese Mutante wurde über Transposon-Mutagenese via Transposom-Technologie hergestellt¹⁴⁷. Bei diesem Verfahren bildet das Transposom einen stabilen Komplex, bestehend aus dem Enzym EZ::TN Transposase und dem Transposon EZ::TN<KAN-2> selbst, welches das Kanamycin-Resistenzgen (Kan^R) enthält. Mittels Elektroporation wurde dieser Komplex in das Bakterium eingeschleust. Dort fand die Insertion des Transposons an einer zufälligen Stelle des Wirtsgenoms durch die Mg²⁺ aktivierte Transposase statt. *B. henselae* BadA⁻ wurde auf Blut-Agar-Platten mit 30 µg/ml Kanamycin ausgestrichen und bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Nach 5 Tagen wurden sie mit Wattestäbchen in PBS geerntet und in 20 % Glycerin-LB-Medium bei - 80 °C gelagert. Die Bakterienanzahl wurde durch serielles Ausplattieren kontrolliert.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Für alle Experimente dieser Arbeit wurden Zellen der Linie HeLa 229 (ATCC, Rockville, MD, USA) verwendet. HeLa 229 ist eine humane Epithelzelllinie, die von einem besonders stark proliferierenden Zervixkarzinom abstammt und die speziell für experimentelle Zwecke kultiviert wurde.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten HeLa-Zellen wurden im Zellkultur-Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Materialien und Lösungen wurden bereits steril vom Hersteller bezogen oder sterilfiltriert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturmedium (s. **Tab. 1**) in Gewebekultur-Flaschen.

Nach Adhärenz der Zellen am Flaschenboden entstand innerhalb einer Woche ein konfluenter Zellrasen. Durch Inkubation in 5 ml Trypsin/EDTA für ca. 5 min bei RT wurden Adhäsionsproteine der Zelloberfläche gespalten, worauf sich die Zellen von dem Flaschenboden ablösen ließen. Das Trypsin/EDTA wurde anschließend durch Zugabe von 15 ml Medium inaktiviert, je nach Bedarf wurden die Zellen darauf im Verhältnis 1:5 bis 1:10 in neuen Flaschen weiterkultiviert.

2.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

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

2.2.2.3 Infektionsexperimente

Die Infektionsexperimente zur Bestimmung der Zytokin-Konzentration im Überstand wurden zur Vermeidung unspezifischer VEGF-Produktion in FCS-freiem Medium durchgeführt, die Infektionsexperimente mit bakteriellen Co-Kulturen wurden zusätzlich in Antibiotika-freiem Medium vollzogen.

Am Tag vor der Infektion wurden die Zellen - wie bereits beschrieben - mit Trypsin/EDTA aus den Flaschen gelöst, in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und nach Einstellung der gewünschten Konzentration mit dem entsprechendem Medium in 6-well-Platten (1×10^6 Zellen pro well) bzw. 24-well-Platten (1×10^5 Zellen pro well) ausgesät. 2 h vor Infektion wurde das Antibiotika-haltige Medium abgesaugt und durch Antibiotika-freies Medium ersetzt.

Die Bakterien wurden aufgetaut, durch Zentrifugieren (3800 g, 4 °C, 10 min) vom LB-Medium gereinigt und auf eine MOI von 250 eingestellt. Das Medium

der Zellen wurde abgesaugt und die eingestellte Bakterienlösung anschließend zugegeben.

Als Negativkontrolle diente im 24-well-Format reines Medium; als Positivkontrolle wurde Medium mit 25 ng/ml PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) verwendet. Um HIF-1 α intrazellulär nachzuweisen, wurde das 6-well-Format gewählt. Hierbei dienten Zellen in reinem Medium als Negativkontrolle; als Positivkontrolle wurde Hypoxie verwendet. Dazu wurden Zellen in reinem Medium durch Zugabe von Anaerobierbeuteln in Anaerobiertöpfen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, eingetretene Hypoxie wurde mittels Teststreifen überprüft.

2.2.2.4 Modulation der Infektionsexperimente: Zugabe von MAP-Kinase-Inhibitoren

An MAP-Kinase-Inhibitoren wurden der p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 202190 in einer Konzentration von 5 μ M bzw. 10 μ M und der MEK1-Inhibitor PD 98059 in einer Konzentration von 25 μ M bzw. 50 μ M verwendet.

Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät und das Antibiotika-haltige Medium 2 h vor Infektion durch Antibiotika-freies Medium ausgetauscht. Die MAP-Kinase-Inhibitoren wurden in Antibiotika-freiem Medium auf die gewünschte Konzentration eingestellt und eine halbe Stunde vor Infektion den Zellen zugefügt. Den Zellen, die später infiziert werden sollten, wurde ein Volumen von 900 μ l Inhibitor-haltigem Medium zugegeben, während zu den Zellen, die als Negativkontrolle dienten und nicht infiziert werden sollten, das gesamte Volumen von 1000 μ l pipettiert wurde. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden die Bakterien in Antibiotika-freiem Medium so eingestellt, dass sie die zehnfach-konzentrierte Konzentration der gewünschten erhielten. Den zu infizierenden Zellen, die bis dahin nur ein Volumen von 900 μ l erhalten hatten, wurden 100 μ l der zehnfach-konzentrierten Bakterienlösung zugegeben, so dass sich im well die Bakterienlösung auf die gewünschte Konzentration einstellte. Durch dieses Vorgehen wurde gewährleistet, dass über den Zeitpunkt der Infektion hinaus die Zellen den MAP-Kinase-Inhibitoren ausgesetzt waren. Die durch die Volumenzugabe der Bakterienlösung erfolgte Verdünnung der

Inhibitorkonzentration war zu vernachlässigen. Mit der Positivkontrolle wurde analog vorgegangen: eine halbe Stunde vor Infektion wurden 900 µl Inhibitorlösung bzw. reines Medium zugegeben. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden die 900 µl anschließend mit einer zehnfach-konzentrierten PMA-Konzentration (250 ng/ml) auf das Volumen von 1000 µl aufgefüllt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Präparation von Proteinextrakten zur Bestimmung von HIF-1 α

HeLa-Zellen wurden einen Tag vor Infektion in 6-well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. 6 h nach Infektion wurden die Zellen mit eiskaltem PBS einmal gewaschen und anschließend mit 250 µl Lysepuffer (s. **Tab. 7**) versehen. Das entstandene Zelllysate wurde unverzüglich in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt und gekühlt, verbliebene Zellreste wurden mit Hilfe einer Pipette vom Boden der 6-well-Platte gelöst und dem entsprechenden Eppendorf-Gefäß zugefügt. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Zelllysate 5 sec bei maximaler Geschwindigkeit mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Gefäße für 10 min auf einem Heizblock bei 70 °C inkubiert. Gelagert wurden die bearbeiteten Lysate bei - 80 °C .

2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Durch Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine tritt eine Veränderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form) ein. Dabei korreliert die Menge an Protein mit der Absorption bei 595 nm, was eine Quantifizierung des Proteingehaltes einer Lösung ermöglicht.

Um die Gesamtproteinmenge der Proteinextrakte aus HeLa-Zellen zu bestimmen, wurden 5 µl davon 1:20 mit H₂O dest. verdünnt und in eine 96-well-Platte überführt. Nach Zugabe von 20 µl Färbereagenz wurde die Absorption der Lösung bei 595 nm im ELISA-Reader bestimmt. Mit bekannten Mengen BSA (20, 2, 0,2 mg/ml) wurde eine Eichgerade erstellt und so die Proteinmenge der Extrakte bestimmt.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei diesem Verfahren werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Masse getrennt. SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) 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, was den Einfluss der nativen Oberflächenstruktur auf die Wanderungseigenschaften der Proteine aufhebt. 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 Molekulargewichtes³³, 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. Zur optimalen Darstellung von HIF-1 α mit einer Molekülgröße von 120 kDa wurde ein Trenngel mit einer 8-prozentigen Acrylamid-Konzentration gewählt.

Dazu wurden Arcylamid/Bisacrylamid, Tris-Puffer, H₂O bidest. und SDS-Lösung nach untenstehendem Schema gemischt (s. **Tab. 8**) und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS eingeleitet. Zuerst wurde das Trenngel in eine Vertikalkammer bis zu 2/3 des Endvolumens gefüllt und mit H₂O-gesättigtem n-Butanol überschichtet, um eine glatte Trennfläche zu erhalten. Nach halbstündiger Polymerisation des Trenngels und Entfernung des n-Butanols wurde das Sammelgel in das verbleibende Volumen der Gelkammer gegossen und ein 10-well-Kamm eingesetzt. Nach halbstündiger Polymerisation des Sammelgels erfolgte der Probenauftrag. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit einem Viertel ihres Volumens mit 5 x SDS-Probenpuffer (s. **Tab. 4**) versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die SDS-Elektrophorese nach Laemmli¹⁰² wurde in 1 x Elektrophorese-Puffer (s. **Tab. 4**) bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel durchgeführt.

Tab. 8: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele (für 2 Gele)

	Trenngel (8 %)	Sammelgel
AA/BA (37,5:1)	2,7 ml	0,5 ml
Tris/HCl (1,5 M, pH 8,6)	2,5 ml	
Tris/HCl (0,5 M, pH 6,8)		0,38 ml
H ₂ O dest.	4,6 ml	2,1 ml
SDS-Lösung (10 %)	100 µl	30 µl
TEMED	6 µl	3 µl
APS (10 %)	100 µl	30 µl

2.2.3.4 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 (Western blot), wobei das SDS im Laufe des Transfers abgetrennt wird. Anschließend können geblottete Proteine durch eine spezifische und sehr sensitive Antikörperreaktion nachgewiesen werden ¹⁷⁸.

Für den Proteintransfer von SDS-Gelen auf eine PVDF-Membran wurde die Membran zuerst kurz in Methanol eingelegt und daraufhin für 2 min in H₂O 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 Bio-Rad-Blotkammer eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte in Blot-Puffer (s. **Tab. 5**) bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA für 60 min.

Zum Fixieren der Banden 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 0,1 % Ponceau S/7 % Trichloressigsäure überprüft; der Farbstoff konnte durch Abspülen mit H₂O dest. anschließend wieder entfernt werden. Die PVDF-Membran wurde zur Blockierung von freien Bindungsstellen für 2 h bei RT in Blockpuffer (s. **Tab. 5**) auf einem Gelschüttler inkubiert. Nach Blockierung wurde sie über Nacht bei

+ 4 °C auf einem Gelschüttler mit anti-HIF-1 α -Antikörper (1:1000 verdünnt in Blockpuffer) inkubiert. Nach Waschen der Membran mit Waschpuffer (3 x 5 min, RT; s. **Tab. 5**) wurde die Membran mit einem Sekundär-Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war (anti-mouse, 1:1000 verdünnt in Blockpuffer), für 1 h auf einem Gelschüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min mit Waschpuffer) wurde die Membran mit ECL-Reagenz ca. 5 min inkubiert und im Anschluß daran zwischen zwei Tageslichtprojektor-Folien in eine Entwicklerkassette gelegt. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurde im Dunkeln für 2 - 10 min ein Film eingelegt, der anschließend maschinell entwickelt wurde.

2.2.4 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen: ELISA

2.2.4.1 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Die Zytokinproduktion wurde aus Zellkulturüberständen nach bakterieller Stimulation mittels ELISA untersucht. Die Zellkulturüberstände wurden 8 h, 24 h, 48 h sowie 72 h nach Infektion abgenommen. Nach Zentrifugation (20 000 g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand bis zu weiteren Untersuchungen bei - 20 °C gelagert.

2.2.4.2 ELISA

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

Standardkurve mit rekombinanten Zytokinen (rh IL-8, Pharmingen und rh VEGF, R&D Systems) wird die absolute Konzentration ermittelt.

2.2.4.3 VEGF-ELISA

Zum Nachweis von VEGF im Überstand wurde ein bereits mit murinem monoklonalem Antikörper beschichteter ELISA der Firma R&D Systems verwendet.

Zu Beginn des 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 wieder dreimal gewaschen. Zuletzt wurden 200 µl Entwicklerlösung hinzugegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung beendet. Die Zytokinkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 540 nm im ELISA-Photometer bestimmt.

2.2.4.4 IL-8-ELISA

50 µl des entsprechenden monoklonalen Primärantikörpers in einer Konzentration von 3 µg/ml in 0,1 M Na₂HPO₄ (pH 9) wurden über Nacht bei + 4 °C in einer ELISA-Platte inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch viermaliges Waschen mit PBS/Tween entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit Blockierungspuffer (s. **Tab. 6**) für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Nach erneutem viermaligen Waschen wurden 100 µl der Zellkulturüberstände in die einzelnen wells pipettiert. Als Standardkurve wurden verschiedene Konzentrationen (0-800 pg/ml) von rekombinantem humanem IL-8 verdünnt in Kulturmedium verwendet. Die Reaktion der in den Kulturüberständen befindlichen Zytokine mit denen an der ELISA-Platte gebundenen Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei + 4 °C. Am nächsten Tag wurde erneut viermal gewaschen. Die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers (0,5 µg/ml) erfolgte mit einem Volumen von 100 µl für

1 - 2 h bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen wurden je 50 μ l Konjugat auf die einzelnen wells verteilt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurde PNPP in Substratpuffer zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml aufgelöst und in einem Volumen von 50 μ l pro well 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.

2.2.5 Adhäsionsexperiment von *B. henselae* WT, *B. henselae* Pil⁻ und *B. henselae* BadA⁻ an Kollagen

Um das Adhäsionsvermögen von *B. henselae* WT, *B. henselae* Pil⁻ und *B. henselae* BadA⁻ zu analysieren, wurden Coverslips in ein 24-well-Format gelegt und anschließend mit einer Kollagenlösung der Konzentration 0,1 mg/ml über Nacht kollagenisiert. Alle drei Bakterienstämme wurden in reinem Medium in einer Konzentration von $2,5 \times 10^7$ pro well auf die kollagenisierten Coverslips gegeben und anschließend für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Nach einstündiger Wartezeit wurden die nicht adhärennten Bakterien durch zweimaliges vorsichtiges Waschen mit reinem Medium von den Coverslips abgespült. Im Anschluss daran wurden die adhärennten Bakterien mit 200 μ l DAPI (1 μ g/ml) gefärbt; der Farbstoff wurde nach 10-minütiger Inkubationszeit durch einmaliges Waschen mit PBS wieder entfernt. Die Coverslips wurden dem 24-well-Format entnommen und luftgetrocknet. Die getrockneten Coverslips wurden mit der Bakterien-behafteten Seite nach unten auf einen mit einem Tropfen Fluoroprep versehenen Objektträger gelegt, so dass sich die Bakterien und der Tropfen Fluoroprep zwischen dem Objektträger und dem Coverslip befanden. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 2 h bei + 4 °C wurden die Coverslips auf dem Objektträgern mit Entellan abgedichtet und konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop (CLSM) ausgewertet werden.

2.2.6 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Es wurde jeweils eine Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Datenbewertung erfolgte über den Student t-Test zur Prüfung der Gleichheit der Mittelwerte. Die Differenz von Werten mit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant beurteilt²⁰⁴.

3 Ergebnisse

3.1 Zytokin-Induktion durch *B. henselae*

In vorausgegangenen Versuchen konnte mittels Gene-chip Experimenten gezeigt werden, dass nach Infektion von HeLa-Zellen mit *B. henselae* bestimmte Gene im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen vermehrt transkribiert werden (s. Anhang, **Tab. 1**)⁹¹. Sechs Stunden nach Infektion wurden insgesamt 20 Gene mit einer mehr als zweifachen Induktion nachgewiesen. Von mindestens sieben dieser induzierten Gene ist bekannt, dass sie eine Rolle in der Angiogenese spielen. Besonders das vaskuloproliferativ wirkende Zytokin VEGF beinhaltet eine Schlüsselrolle in der physiologischen als auch pathologischen Angiogenese⁵². Neben VEGF konnte noch eine Induktion von drei weiteren Genen mit angioproliferativer Wirkung nachgewiesen werden. Im einzelnen handelte es sich bei diesen um die Gene der Zytokine IL-8, ADM und IGFBP-3, die allesamt von Zellen sekretiert werden und somit mittels ELISA bzw. RIA in Zellkulturüberständen vermessen werden konnten.

3.1.1 Nachweis der VEGF-Induktion nach Infektion mit *B. henselae* mittels ELISA

Um die VEGF-Induktion von HeLa-Zellen nach Infektion zu analysieren, wurden die Zellen mit *B. henselae* infiziert. Die Zellkulturüberstände wurden zu den Zeitpunkten 8 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h nach Infektion abgenommen und mittels ELISA auf VEGF vermessen. Als Positivkontrolle diente PMA, als Negativkontrolle wurde reines Zellkulturmedium verwendet. Die höchste Konzentration von VEGF nach Infektion mit *B. henselae* konnte nach 48 h mit einem Stimulationsindex von 4,8 bzw. nach 72 h mit einem Stimulationsindex von 3,3 nachgewiesen werden (s. **Abb. 3**). Der Stimulationsindex beschreibt das Verhältnis des zu untersuchenden Wertes zum Wert der Negativkontrolle; in diesem Fall errechnete er sich aus dem Wert der mit *B. henselae* infizierten Probe durch den Wert der Negativkontrolle. Aus den Ergebnissen dieses Experimentes kann geschlossen werden, dass die Infektion mit *B. henselae* zu einer Stimulation der VEGF-Sekretion in HeLa-Zellen führt, wie es die Resultate

der Gene-chip Experimente auf RNA-Ebene erwarten ließen und wie es von früheren Experimenten ausgehend zu erwarten war⁹⁰.

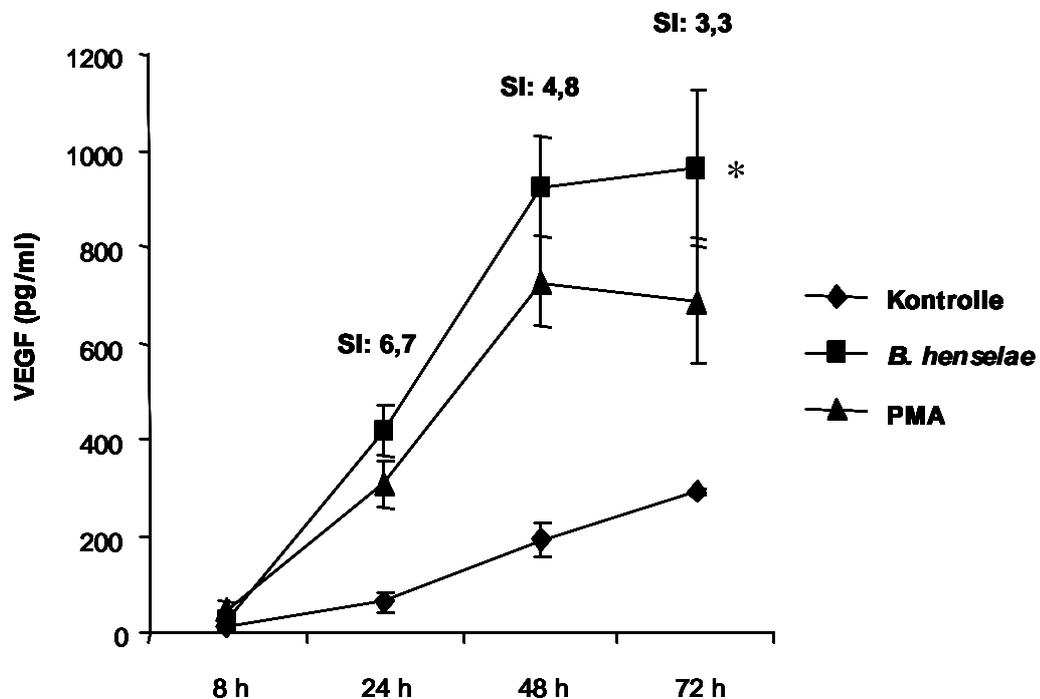


Abb. 3: VEGF-Produktion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*.

Messung der VEGF-Konzentration mittels ELISA. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI: 250) infiziert und die Zellkulturüberstände nach 8 h, 24 h, 48 h und 72 h abgenommen. Die Positivkontrolle bestand aus PMA (25 ng/ml). SI: Stimulationsindex. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle.

3.1.2 Nachweis der IL-8-Induktion nach Infektion mit *B. henselae* mittels ELISA

Nach Messung der VEGF-Konzentration wurden dieselben Zellkulturüberstände anschließend mittels ELISA auf IL-8 vermessen. Vergleichbar dem durch *B. henselae* bedingten Anstieg der VEGF-Konzentration war 48 h nach Infektion ein deutlicher Anstieg an IL-8 im Zellkulturüberstand messbar (s. **Abb. 4**). 48 h nach Infektion betrug der Stimulationsindex 3,6. 72 h nach Infektion erhöhte er sich auf 4,1. Das als Positivkontrolle eingesetzte PMA induzierte die IL-8-Sekretion so stark, dass die Werte den messbaren Bereich überschritten

und deshalb hier nicht gezeigt werden. Analog zu den Ergebnissen der VEGF-Messung zeigen die Resultate eine deutliche Induktion der IL-8-Sekretion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*.

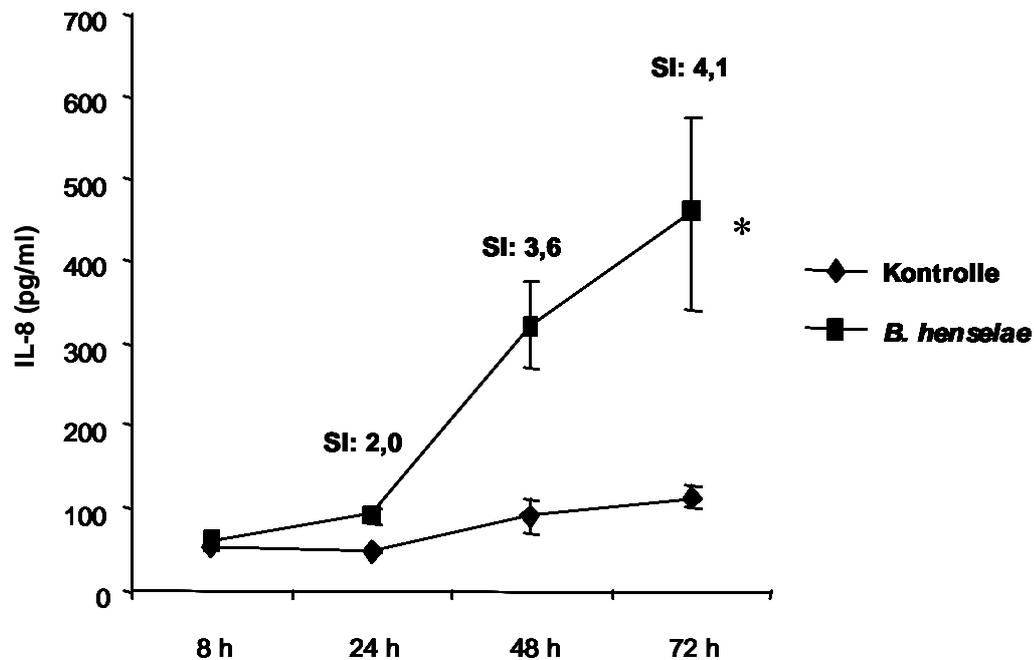


Abb. 4: IL-8-Produktion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*.

Messung der IL-8-Konzentration mittels ELISA. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI: 250) infiziert und die Zellkulturüberstände nach 8 h, 24 h, 48 h und 72 h abgenommen. SI: Stimulationsindex. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle.

3.1.3 Nachweis der Induktion von ADM und IGFBP-3 nach Infektion mit *B. henselae* mittels RIA (*radio immuno assay*)

Da in Gene-chip Experimenten nach Infektion mit *B. henselae* zusätzlich zu den beiden Genen der schon oben besprochenen Zytokine noch die Gene von ADM und IGFBP-3 induziert wurden, erfolgte die Analyse dieser beiden Zytokine mittels RIA im Zellkulturüberstand. Die dazu erforderliche Messung wurde in Kooperation durchgeführt (Dr. Burkhardt Schütt, Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen).

Auch hier zeigte sich ein ähnliches Bild: 48 h sowie 72 h nach Infektion konnte bei beiden Zytokinen ein deutlicher Anstieg der Konzentration beobachtet werden. Bei ADM betrug der Stimulationsindex 48 h nach Infektion 12,6 bzw. 72 h nach Infektion 23,6 (s. **Abb. 5**), für IGFBP-3 konnte nach 48 h ein Index von 4,0 nachgewiesen werden, nach 72 h erhöhte er sich auf 5,1 (s. **Abb. 6**). Die Resultate beider Experimente legen den Schluss nahe, dass beide angioproliferativ wirkenden Zytokine nach Infektion mit *B. henselae* in HeLa-Zellen verstärkt sekretiert werden.

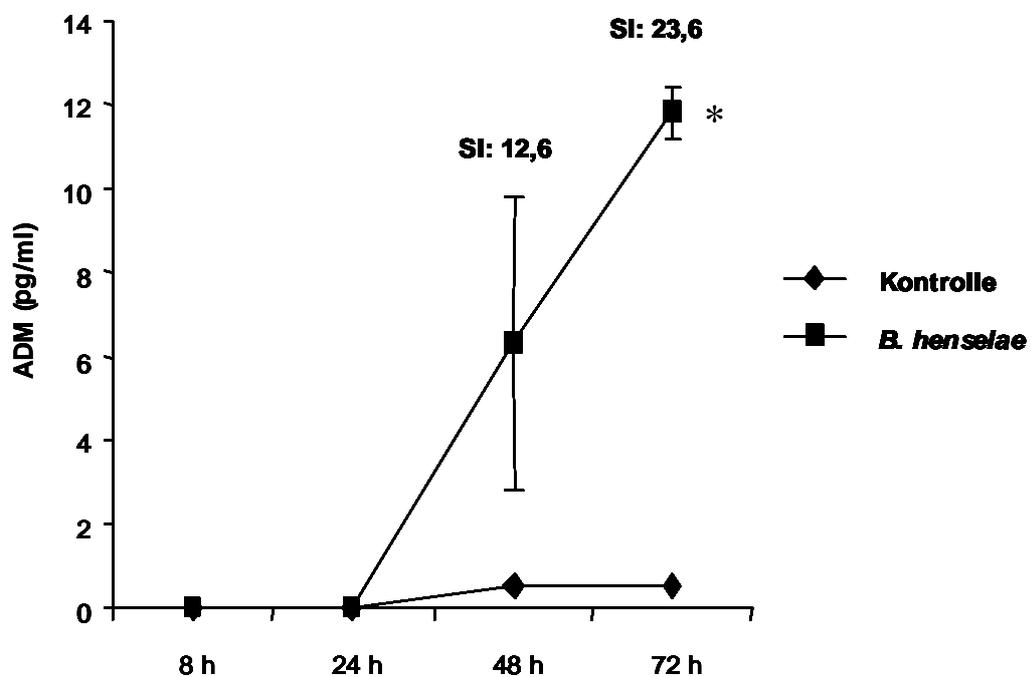


Abb. 5: ADM-Produktion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*.

Messung der Zytokin-Konzentration mittels RIA. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI: 250) infiziert und die Zellkulturüberstände nach 8 h, 24 h, 48 h und 72 h abgenommen. RIA in Kooperation mit Dr. Burkhardt Schütt, Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. SI: Stimulationsindex. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle.

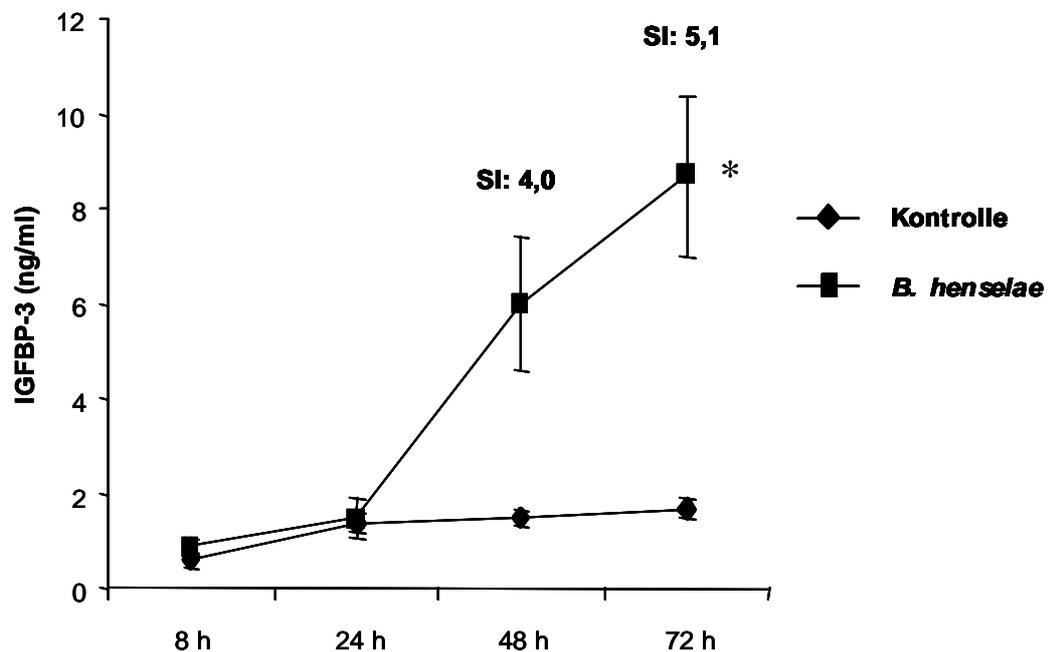


Abb. 6: IGFBP-3-Produktion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*.

Messung der Zytokin-Konzentration mittels RIA. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI: 250) infiziert und die Zellkulturüberstände nach 8 h, 24 h, 48 h und 72 h abgenommen. RIA in Kooperation mit Dr. Burkhardt Schütt, Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. SI: Stimulationsindex. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle.

Zusammenfassend kann aus den Resultaten der obigen vier Experimente geschlossen werden, dass nach Induktion der Gene auf Transkriptionsebene - wie es die Gene-chip Experimente implizierten - die Infektion mit *B. henselae* in HeLa-Zellen zu einer gesteigerten Proteinsynthese und anschließender Sekretion aller vier Zytokine in den Zellkulturüberstand führt.

3.1.4 Einfluss der Expression von BadA auf die proangiogenetische Zytokin-Induktion nach Infektion mit *B. henselae*

Bei einer kürzlich in unserem Labor hergestellten *B. henselae* Transposon-Mutante stellte sich heraus, dass sie defizient für die Expression eines wichtigen Oberflächenproteins (*Bartonella* Adhäsion A, BadA) war. Wie Analysen dieser Mutante ergaben, hatte sie die Fähigkeit zur Bindung an Fibronectin verloren¹⁴⁶. Es sollte nun untersucht werden, ob diese Mutante noch in der Lage war, VEGF bzw. andere angioproliferativ wirkende Zytokine in der Wirtszelle zu induzieren. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen zusätzlich zu *B. henselae* Wildtyp (WT) mit *B. henselae* BadA⁻ infiziert. Auch hier erfolgte die Bestimmung der Zytokin-Konzentration in den Zellkulturüberständen mittels ELISA, sowohl der ADM- als auch der IGFBP-3-RIA wurden in Kooperation durchgeführt (Dr. Burkhardt Schütt, Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen). Die Infektion mit *B. henselae* WT führte zu einem starken Anstieg aller Zytokin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand (s. **Abb. 7**). Für *B. henselae* BadA⁻ konnte dagegen im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikante Induktion von VEGF, IL-8, ADM und IGFBP-3 gemessen werden. Zusammengefaßt zeigen diese Resultate, dass *B. henselae* BadA⁻ nicht mehr oder nur in sehr geringem Masse in der Lage ist, eine Sekretion dieser vier angioproliferativ wirkenden Zytokine zu induzieren und legen die Vermutung nahe, dass die Expression von BadA eine wesentliche Rolle in der Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort spielt.

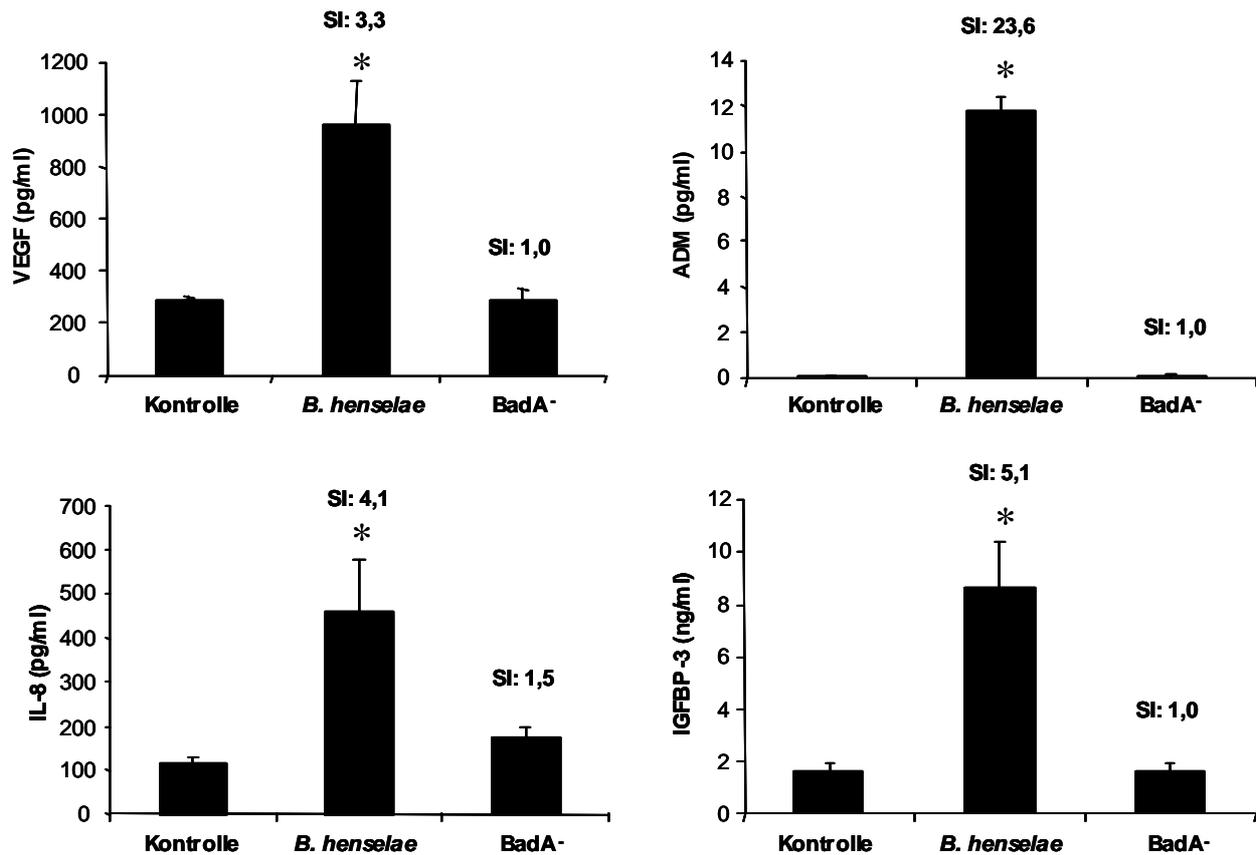


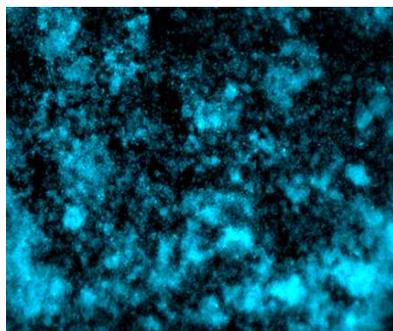
Abb. 7: Zytokin-Produktion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae* WT und *B. henselae* *BadA*⁻.

Messung der Zytokin-Konzentration mittels ELISA (VEGF, IL-8) und RIA (ADM, IGFBP-3). HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* WT und *B. henselae* *BadA*⁻ (beide MOI: 250) infiziert und die Zellkulturüberstände nach 72 h abgenommen. ADM- und IGFBP-3-RIA in Kooperation mit Dr. Burkhardt Schütt, Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen. SI: Stimulationsindex. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle.

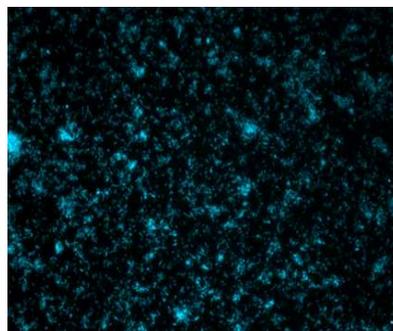
3.2 Einfluss der Expression von *BadA* auf die Kollagenbindungsfähigkeit von *B. henselae*

Wie aus vorangegangenen Versuchen schon bekannt war, besitzt *B. henselae* die Fähigkeit, an Kollagen und Fibronectin zu adhären ¹⁴⁶. Es sollte nun geklärt werden, ob die Transposon-Mutante *B. henselae* *BadA*⁻ neben dem Verlust der Fibronectinbindungsfähigkeit auch das Vermögen der Adhärenz an Kollagen, einer weiteren wichtigen Komponente der extrazellulären Matrix,

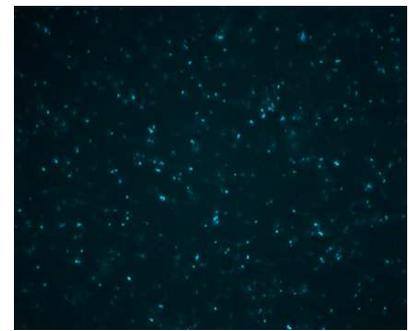
verloren hat. Zusätzlich zu den genannten Bakterien wurde eine Pilus-negative Spontanvariante von *B. henselae* verwendet (*B. henselae* Pil⁻). In gleicher Keimzahl wurden alle drei Bakterien zu diesem Zweck auf Kollagen-beschichtete Coverslips zentrifugiert und im Anschluss daran für eine Stunde inkubiert. Nach gründlichem Waschen zur Entfernung nicht-adhärrierter Bakterien wurden die adhärrierten Bakterien mittels DAPI angefärbt und nachfolgend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Deutlich ist eine verstärkte Kollagenbindung von *B. henselae* WT zu erkennen, während von *B. henselae* Pil⁻ und *B. henselae* BadA⁻ nur wenige Bakterien an der Kollagenoberfläche gebunden haben (s. **Abb. 8**). Ferner ließ sich zwischen *B. henselae* Pil⁻ und *B. henselae* BadA⁻ ein weiterer Abfall des Adhärenzvermögens an Kollagen feststellen. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass sowohl *B. henselae* Pil⁻ als auch *B. henselae* BadA⁻ die Fähigkeit der Kollagenbindung weitestgehend verloren haben. Die Ergebnisse veranschaulichen die wesentliche Bedeutung der Expression von BadA bei der Interaktion des Bakteriums mit Kollagen.



***B. henselae* WT**



***B. henselae* Pil⁻**



***B. henselae* BadA⁻**

Abb. 8: Adhärenz von *B. henselae* WT, *B. henselae* Pil⁻ und *B. henselae* BadA⁻ an Kollagen.

Bakterien wurden mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^7$ /ml auf Kollagen-beschichtete Coverslips zentrifugiert (300 g), für eine Stunde inkubiert und anschließend mit DAPI gefärbt. Detektion mittels Fluoreszenzmikroskopie (63-fach).

3.3 Nachweis der Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 durch *B. henselae*

Da in den Gene-chip Experimenten nachgewiesen werden konnte, dass von den 20 induzierten Genen 14 direkt oder indirekt durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert werden^{134,163}, lag die Vermutung nahe, dass HIF-1 nach Infektion mit *B. henselae* aktiviert wird. Eine Ausnahme bildet die Geninduktion von IL-8: von diesem ist bekannt, dass es nicht durch HIF-1, sondern durch NF- κ B reguliert wird⁸². Nachdem im Zellkulturüberstand die durch HIF-1 regulierten Zytokine VEGF, ADM und IGFBP-3 nachweisbar waren, bestand der nächste Schritt im Nachweis der Aktivierung von HIF-1 durch direkten Nachweis der α -Untereinheit (HIF-1 α).

3.3.1 Nachweis von HIF-1 α im Western blot

Da für das Heterodimer HIF-1 die α -Untereinheit die entscheidende regulierbare Untereinheit darstellt (die β -Untereinheit ist stets in hoher Konzentration intrazellulär nachzuweisen und unterliegt nicht der Regulation), konnte sich der Nachweis der Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 auf HIF-1 α beschränken¹⁵⁰. Dazu wurden Ganzzelllysate aus HeLa-Zellen in einem Zeitfenster von 4 – 6 h nach Infektion mit *B. henselae* hergestellt und mittels Western blot analysiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen für 4 – 6 h hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und anschließend lysiert. Sichtbare Banden in der für HIF-1 α zu erwartenden Höhe von 120 kDa zeigten für die Positivkontrolle eine deutliche Zunahme an intrazellulärem HIF-1 α infolge der Hypoxie (s. **Abb. 9**). Auch bei den mit *B. henselae* infizierten Zellen ließ sich in der entsprechenden Höhe eine Bande und somit ein Anstieg der HIF-1 α -Konzentration intrazellulär nachweisen. Aus den Ergebnissen dieses Experimentes kann geschlossen werden, dass die Infektion mit *B. henselae* in HeLa-Zellen zu einer Aktivierung und folglich zu einem intrazellulären Konzentrationsanstieg des Transkriptionsfaktors HIF-1 α führt.

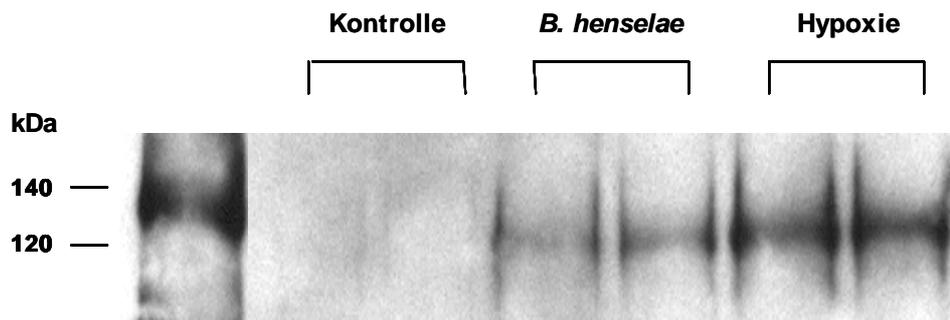


Abb. 9: Nachweis von HIF-1 α in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*.

HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI: 250) infiziert und nach 6 h lysiert. Die Ganzzelllysate wurden mittels Western blot analysiert (anti-HIF-1 α : 1:1000). Die Negativkontrolle bestand aus uninfizierten Zellen, die Positivkontrolle bestand aus Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden.

3.4 Zytokin-Induktion von *B. henselae* unter Anwesenheit von MAP-Kinase-Inhibitoren

MAP-Kinasen sind an einer Vielzahl verschiedener Prozesse der Wirtszelle im Sinne einer Reaktion auf wechselnde Umweltbedingungen wie z.B. Hypoxie oder Infektionen beteiligt. Um weiteren Aufschluss über die Signaltransduktionswege nach Infektion mit *B. henselae* zu erhalten und um zu analysieren, ob MAP-Kinasen an der Induktion von angioproliferativ wirkenden Zytokinen beteiligt sind, wurden Infektionsexperimente mit *B. henselae* unter Anwesenheit von MAP-Kinase-Inhibitoren durchgeführt. Im einzelnen wurde zur Hemmung der p38-MAP-Kinase der p38-Inhibitor SB 202190 und zur Hemmung des p42/p44-Signaltransduktionsweges der MEK1-Inhibitor PD 98059 verwendet.

3.4.1 Hemmung der durch *B. henselae* hervorgerufenen Zytokin-Induktion durch p38-MAP-Kinase-Inhibitor

Zum Nachweis der Hemmung der durch *B. henselae* hervorgerufenen Zytokin-Induktion wurde zu HeLa-Zellen 30 min vor Infektion Medium zugegeben, das den p38-MAP-Kinase-Inhibitor in einer Konzentration von 5 μ M bzw. 10 μ M enthielt. Zum Zeitpunkt der Infektion wurde 100 μ l Medium mit *B. henselae*

(10-fach konzentriert) zugegeben. Das Inhibitor-haltige Medium wurde dabei nicht gewechselt, so dass die Zellen für die Dauer des gesamten Experimentes der Wirkung des Inhibitors ausgesetzt waren (s. **Kap. 2.2.2.4**). 72 h nach Infektion wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Konzentration von VEGF und IL-8 mittels ELISA bestimmt. Die Infektion mit *B. henselae* führte analog zu vorherigen Experimenten zu einem Konzentrationsanstieg beider Zytokine im Zellkulturüberstand. Nach Zugabe des Inhibitors sank in den infizierten Proben sowohl die VEGF- als auch die IL-8-Konzentration (s. **Abb. 10**). Weiterhin sank die Konzentration beider Zytokine nach Verdopplung der Inhibitorkonzentration. Somit konnte gezeigt werden, dass der p38-MAP-Kinase-Inhibitor konzentrationsabhängig zu einer Hemmung der durch *B. henselae* induzierten Zytokinantwort führt. Nach Inhibitorzugabe konnte neben der Abnahme der Zytokinkonzentration nach Infektion mit *B. henselae* auch eine Abnahme der Zytokinkonzentration der Negativkontrollen festgestellt werden, so dass die Abnahme von VEGF und IL-8 nicht allein auf die Hemmung der Signaltransduktion durch den p38-MAP-Kinase-Inhibitor nach Infektion mit *B. henselae* zurückzuführen ist. Trotz dieser Einschränkungen deuten die Ergebnisse dieses Experimentes an, dass die p38-MAP-Kinase einen Einfluss auf die durch *B. henselae* hervorgerufene Zytokin-Induktion besitzt.

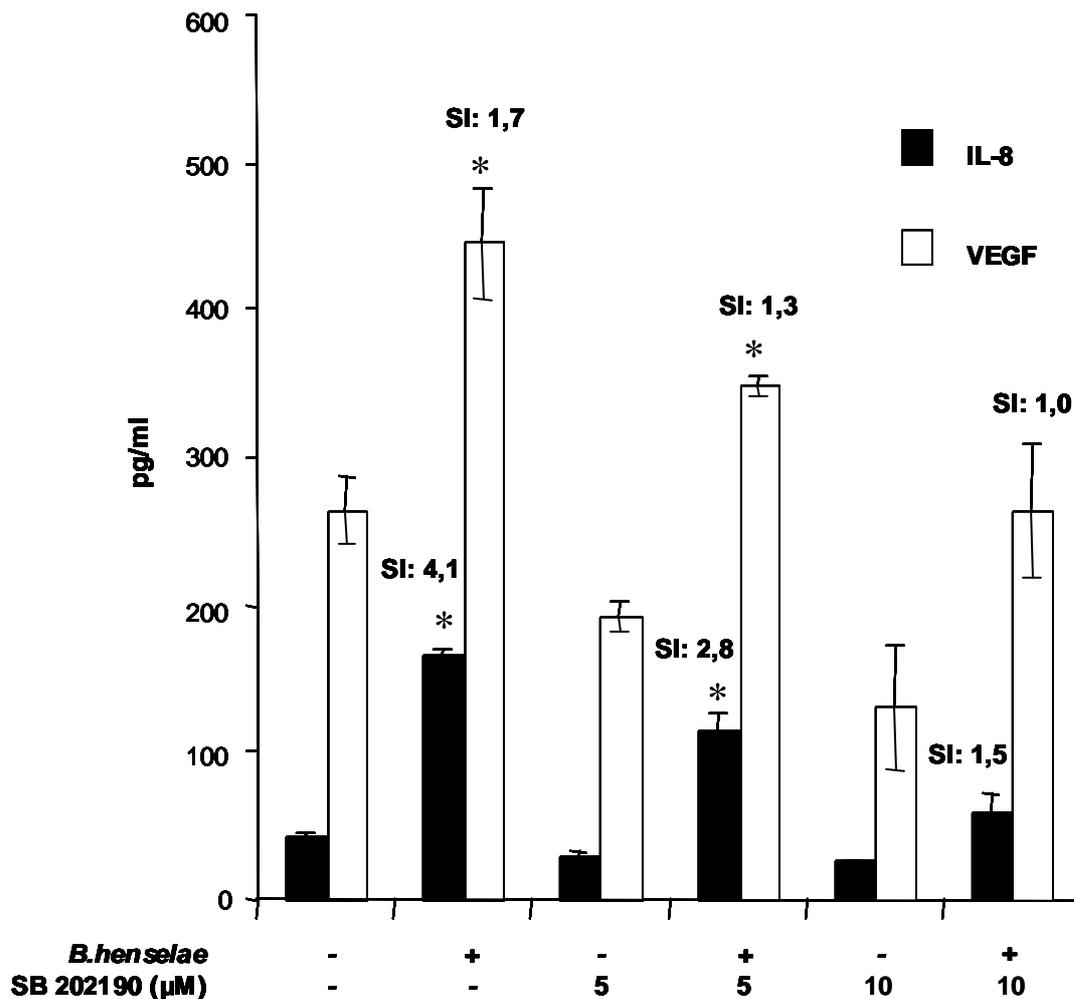


Abb. 10: VEGF- und IL-8-Produktion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae* unter Anwesenheit des p38-MAP-Kinase-Inhibitors SB 202190.

Messung der Zytokin-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA (72 h nach Infektion). Eine halbe Stunde vor Infektion mit *B. henselae* (MOI: 250) wurden HeLa-Zellen mit SB 202190 (5 µM, 10 µM) inkubiert. Die Zellen blieben während des gesamten Versuches der Inhibitorkonzentration ausgesetzt. SI: Stimulationsindex. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle.

3.4.2 Hemmung der durch *B. henselae* hervorgerufenen Zytokin-Induktion durch MEK1-Inhibitor

Analog dem Experiment mit dem p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 202190 wurde mit dem MEK1-Inhibitor PD 98059 verfahren. 30 min vor Infektion mit *B. henselae* wurde Medium mit dem Kinase-Inhibitor der Konzentration 25 µM bzw. 50 µM den Zellen zugegeben. Auch bei diesem Experiment konnte durch den MEK1-Inhibitor eine konzentrationsabhängige Hemmung der durch

B. henselae induzierten Zytokinsekretion gezeigt werden (s. **Abb. 11**). Der p42/p44-Signaltransduktionsweg scheint ebenso wie derjenige, der durch die p38-MAP-Kinase vermittelt wird, einen Einfluss auf die Sekretion von angiogenetisch wirksamen Zytokinen nach Infektion mit *B. henselae* zu haben.

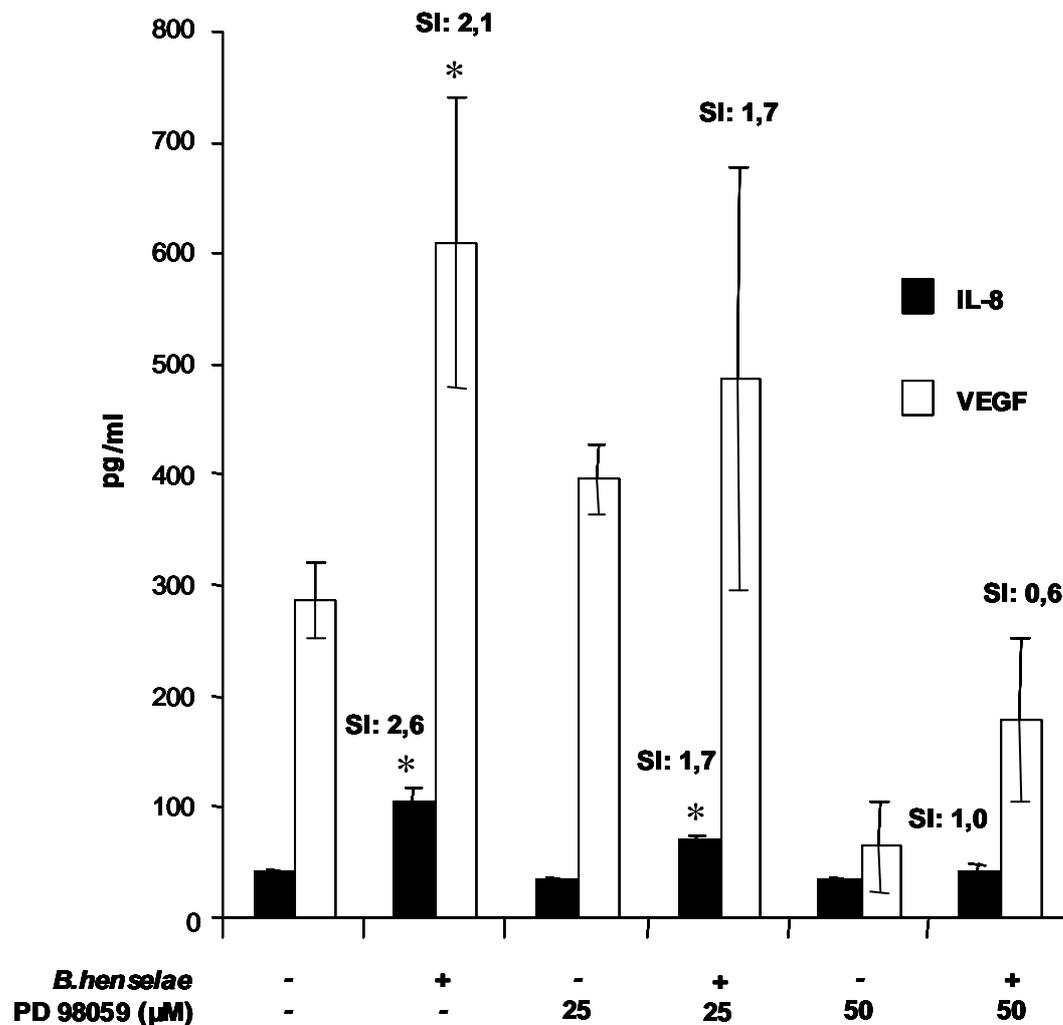


Abb. 11: VEGF- und IL-8-Produktion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae* unter Anwesenheit des MEK1-Inhibitors PD 98059.

Messung der Zytokin-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA (72 h nach Infektion). Eine halbe Stunde vor Infektion mit *B. henselae* (MOI: 250) wurden HeLa-Zellen mit PD 98059 (25 μM , 50 μM) inkubiert. Die Zellen blieben während des gesamten Versuches der Inhibitor-Konzentration ausgesetzt. SI: Stimulationsindex. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle.

3.5 Hemmung der IL-8-Induktion durch NF- κ B-Inhibitor Parthenolid

Von den gesamten 20 Genen, von denen nachgewiesen werden konnte, dass sie mit einer mehr als zweifachen Induktion in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae* exprimiert werden, wird nur IL-8 bekanntermaßen durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert (s. Anhang, **Tab. 1**)⁸². IL-8 besitzt allerdings inflammatorische und angioproliferative Eigenschaften¹⁷⁴. Um die NF- κ B regulierte Induktion von IL-8 von der HIF-1 regulierten proangiogenetischen Zellantwort zu trennen, wurde HeLa-Zellen 30 min vor Infektion mit *B. henselae* der NF- κ B-Inhibitor Parthenolid zugesetzt. Die Anwesenheit des Inhibitors führte zu einem starken Abfall der Konzentration von IL-8 (s. **Abb. 12**). Im Gegensatz dazu fiel der Abfall der VEGF-Sekretion bedeutend geringer aus, der Stimulationsindex fiel unter Anwesenheit von Parthenolid von 3,1 lediglich auf 2,4. Dass sich VEGF nur in geringem Masse durch den NF- κ B-Inhibitor hemmen lässt, erhärtet die Aussage, dass HIF-1 für die Transkription von VEGF verantwortlich ist.

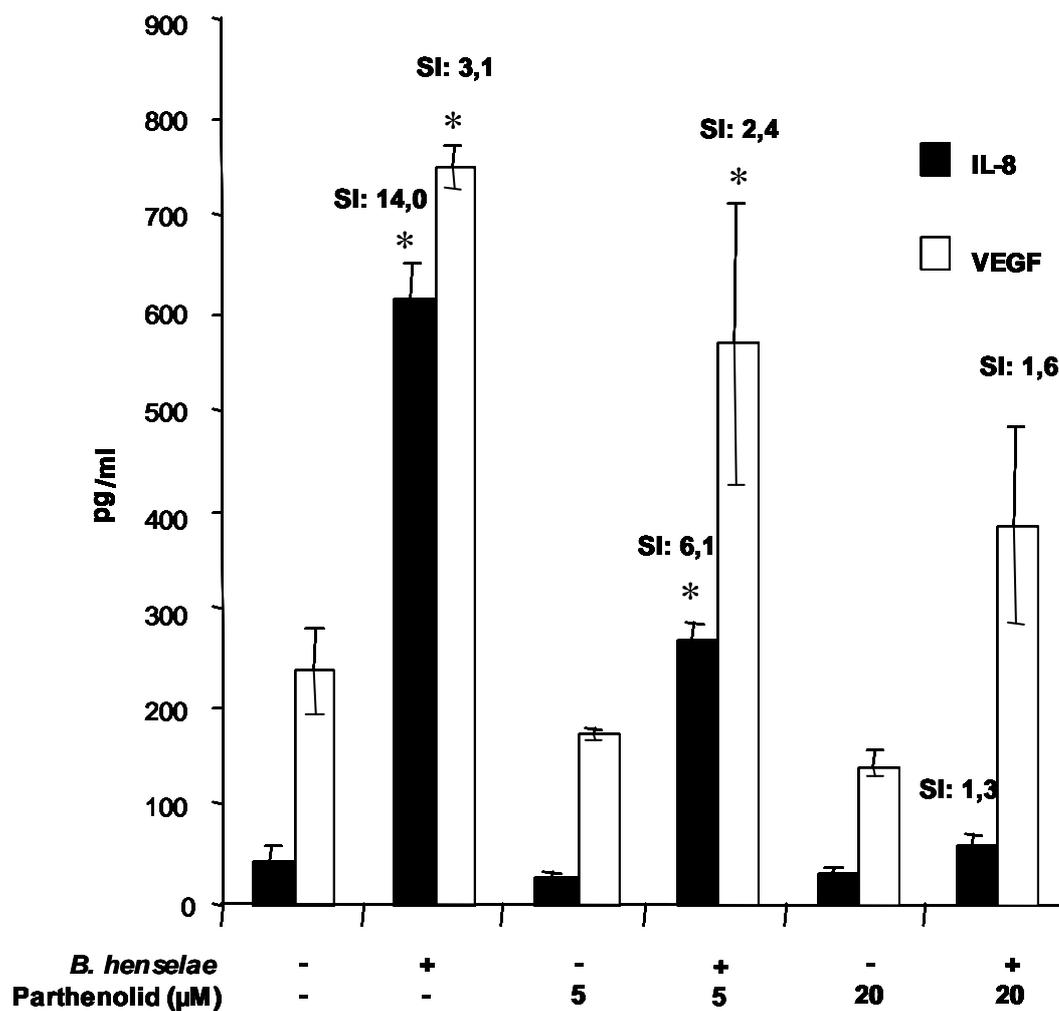


Abb. 12: VEGF- und IL-8-Produktion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae* unter Anwesenheit des NF- κ B-Inhibitors Parthenolid.

Messung der Zytokin-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA (72 h nach Infektion). Eine halbe Stunde vor Infektion mit *B. henselae* (MOI: 250) wurden HeLa-Zellen mit Parthenolid (5 μ M, 20 μ M) inkubiert. Die Zellen blieben während des gesamten Versuches der Inhibitor-Konzentration ausgesetzt. SI: Stimulationsindex. * statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle.

3.6 Zytokin-Induktion durch *B. henselae* und andere Bakterien

Um zu analysieren, ob die Sekretion der angioproliferativ wirkenden Zytokine VEGF und IL-8 nur auf die Infektion mit *B. henselae* beschränkt ist, oder ob sie bei einer Vielzahl bakterieller Infektionen auftritt, wurden Infektionsexperimente mit verschiedenen Kontroll-Bakterien durchgeführt. Neben *B. henselae* wurden HeLa-Zellen mit *Y. enterocolitica* pYV⁺, *Y. enterocolitica* pYV⁻,

E. coli HB 101, *E. coli* HB 101 inv⁺ sowie *L. pneumophila* infiziert. Die Zellkulturüberstände wurden nach 72 h abgenommen und die Konzentration von VEGF mittels ELISA bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass allein *B. henselae* in der Lage war, die VEGF-Sekretion in den Wirtszellen in dem Zeitraum von 72 h zu stimulieren, bei allen anderen Vergleichsbakterien sank die Sekretion von VEGF sogar unter den Wert der Negativkontrolle (s. **Abb. 13**).

Nach Messung der VEGF-Konzentration wurde in denselben Zellkulturüberständen die Konzentration von IL-8 bestimmt (s. **Abb. 14**). Hierbei zeigte sich, dass nach einem Zeitraum von 72 h nicht nur *B. henselae* (SI: 6,5) die IL-8-Sekretion induzierte, sondern auch *Y. enterocolitica* pYV⁻ (SI: 14,8) und *E. coli* HB 101 inv⁺ (SI: 15,4). Bei *Y. enterocolitica* pYV⁺, *E. coli* HB 101 sowie bei *L. pneumophila* konnte keine erhöhte Sekretion von IL-8 im Zellkulturüberstand gemessen werden. Diese Daten bestätigen Ergebnisse, die für *Y. enterocolitica* pYV⁻ bereits publiziert worden waren⁶⁴.

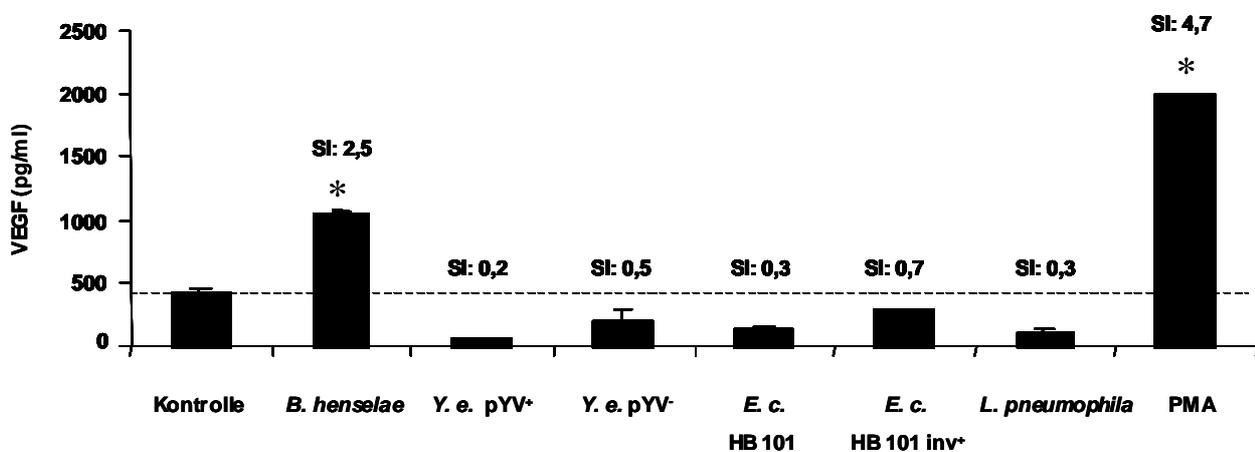


Abb. 13: VEGF-Produktion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* und *L. pneumophila*.

Messung der VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA (72 h nach Infektion). HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI: 250), *Y. enterocolitica* pYV⁺, *Y. enterocolitica* pYV⁻ (beide MOI: 20), *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv⁺ (beide MOI: 100) und *L. pneumophila* (MOI: 100) infiziert. Die Positivkontrolle bestand aus PMA (25 ng/ml). SI: Stimulationsindex.

* statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle.

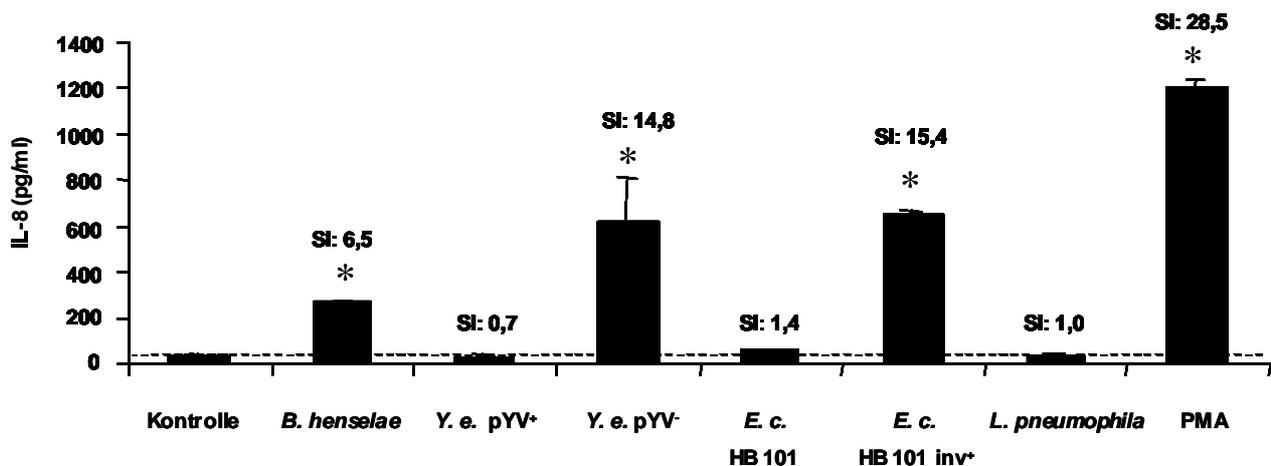


Abb. 14: IL-8-Produktion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* und *L. pneumophila*.

Messung der IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA (72 h nach Infektion). HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI: 250), *Y. enterocolitica* pYV⁺, *Y. enterocolitica* pYV⁻ (beide MOI: 20), *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv⁺ (beide MOI: 100) und *L. pneumophila* (MOI: 100) infiziert. Die Positivkontrolle bestand aus PMA (25 ng/ml). SI: Stimulationsindex.

* statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle.

Aus den Resultaten beider Experimente geht hervor, dass im Vergleich zu allen hier verwendeten Bakterien einzig *B. henselae* die Eigenschaft besitzt, die Expression und Sekretion beider angioproliferativ wirkender Zytokine für den Zeitraum von 72 h konstant zu induzieren.

3.7 Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 durch *B. henselae* und andere Bakterien

Wie bereits beschrieben, führte die Infektion mit *B. henselae* zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 in HeLa-Zellen (s. **Abb. 9**). Es sollte im folgenden nun analysiert werden, ob eine Aktivierung von HIF-1 ausschließlich auf die Infektion mit *B. henselae* beschränkt ist oder ob die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors eine generelle Wirtszellantwort auf eine Vielzahl bakterieller Infektionen darstellt. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen neben *B. henselae* mit den im vorherigen Versuch verwendeten Bakterien, *Y. enterocolitica* pYV⁺, *Y. enterocolitica* pYV⁻, *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv⁺ sowie *L. pneumophila* infiziert und die Aktivierung von

HIF-1 α 6 h nach Infektion analysiert. Hierbei stellte sich heraus, dass nicht nur die Infektion mit *B. henselae* zu einer Aktivierung von HIF-1 α führte, sondern auch die Infektionen mit *Y. enterocolitica* pYV⁺, *Y. enterocolitica* pYV⁻, *E. coli* HB 101 und *E. coli* HB 101 inv⁺ (s. **Abb. 15**). Einzig bei *L. pneumophila* konnte keine Aktivierung von HIF-1 α festgestellt werden. Mit den Ergebnissen dieses Experimentes kann gezeigt werden, dass sich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α keineswegs nur auf die Infektion mit *B. henselae* beschränkt. Die Resultate legen vielmehr den Schluss nahe, dass es sich bei der Aktivierung von HIF-1 α eher um eine vom Erreger unabhängige Reaktion der Wirtszelle auf eine Vielzahl bakterieller Infektionserreger handelt.

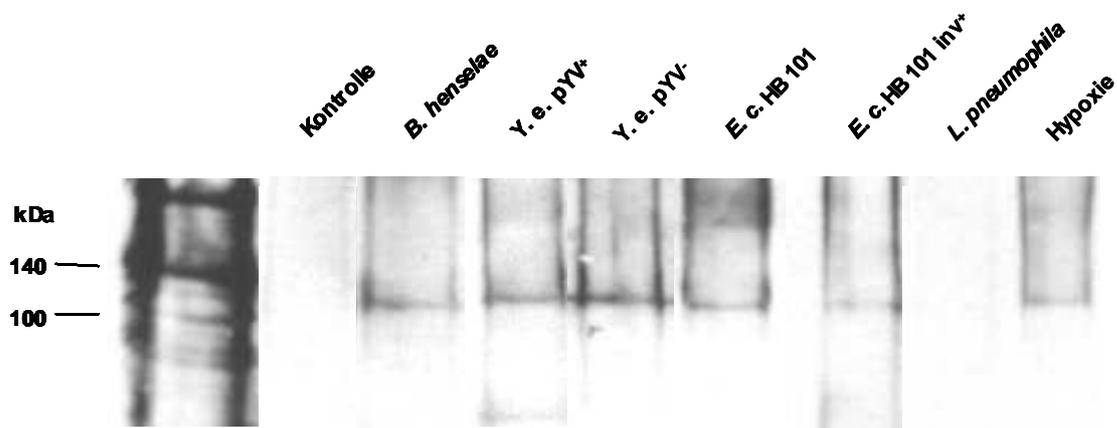


Abb. 15: Nachweis von HIF-1 α in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* und *L. pneumophila*.

HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI: 250), *Y. enterocolitica* pYV⁺, *Y. enterocolitica* pYV⁻ (MOI: 20), *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv⁺ (MOI: 100) und *L. pneumophila* (MOI: 100) infiziert und nach 6 h lysiert. Die Ganzzelllysate wurden anschließend mittels Western blot analysiert (anti-HIF-1 α : 1:1000). Die Negativkontrolle bestand aus uninfizierten Zellen, die Positivkontrolle bestand aus Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden.

4 Diskussion

Die Fähigkeit von *B. henselae*, Endothelzell-Proliferationen hervorzurufen, ist ein einzigartiges Phänomen für bakterielle Infektionserreger. Klinisch kann sich eine Infektion mit *B. henselae* in den Krankheitsbildern der Bazillären Angiomatose (BA) und der Peliosis hepatis (PH) manifestieren³. Vaskuloproliferative Eigenschaften kommen nicht allein *B. henselae* zu, auch *B. quintana* konnte als infektiöses Agens der BA identifiziert werden. Endothelzell-Proliferationen sind ebenfalls die histopathologische Grundlage der Verruga peruana, der chronischen Manifestationsform der durch *B. bacilliformis* hervorgerufenen Carrión'schen Krankheit. Neben *Bartonella* spp. konnten verschiedene virale Erreger als Auslöser von Endothelzell-Proliferationen beim Menschen identifiziert werden: das Humane Herpes Virus-8 (HHV-8), das das Krankheitsbild des Kaposi Sarkoms hervorruft, sowie das Orf-Virus sind Ursache pathologischer Angiogenese^{116,122}. Unter bakteriellen Erregern ist die Fähigkeit zur Induktion pathologischer Angiogenese allein auf die Gattung *Bartonella* beschränkt.

Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, grundlegende Erkenntnisse über die Entstehung der Endothelzell-Proliferationen bei dem Krankheitsbild der Bazillären Angiomatose zu erlangen. Insbesondere die Rollen von proangiogenetisch wirkenden Zytokinen und des Transkriptionsfaktors HIF-1, der eine Schlüsselfunktion in der Angiogenese innehat¹³⁴, wurden untersucht.

4.1 Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort durch *B. henselae*

4.1.1 Induktion von VEGF in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*

Schon früher wurde als Auslöser der durch *B. henselae* ausgelösten Endothelzell-Proliferation ein löslicher Faktor postuliert, von dem man aber zuerst annahm, dass er vom Bakterium selbst sezerniert wird¹⁰⁹. In weiteren Experimenten stellte sich jedoch heraus, dass nicht das Bakterium selbst den unbekanntem Wachstumsfaktor sezerniert, sondern dass dieser von der infizierten Wirtszelle synthetisiert und anschließend sekretiert wird. So konnte in

einem Hühnerembryo-Allantoismembran-Modell nachgewiesen werden, dass der Zellkulturüberstand von monozytären Zellen, die mit *B. henselae* infiziert worden waren, fähig war, eine Neovaskularisation einzuleiten⁶⁰. Damit rückten die von der Wirtszelle sezernierten, vaskuloproliferativen Zytokine in den Mittelpunkt des Interesses. In vorausgehenden Arbeiten konnte *in vitro* der Nachweis der VEGF-Induktion nach Infektion von EA.hy Zellen mit *B. henselae* erbracht werden¹⁸¹. Immunohistochemische Untersuchungen von BA- und PH-Biopsaten, in denen *B. henselae* mittels PCR nachgewiesen wurde, zeigen, dass die Expression von VEGF *in vivo* ebenfalls deutlich erhöht ist⁹⁰. Diese Ergebnisse untermauern die Bedeutung von VEGF bei den durch *B. henselae* hervorgerufenen Krankheitsbildern BA und PH und belegen, dass - ähnlich wie beim Kaposi Sarkom¹¹⁶ - dem angioproliferativ wirkendem Zytokin VEGF auch bei der BA und der PH eine wichtige Rolle zukommt. Diese Daten konnten kürzlich von einer anderen Arbeitsgruppe mit monozytären THP-1 Zellen bestätigt werden¹⁴¹. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es nach Infektion von HeLa-Zellen mit *B. henselae* zu einer Induktion der VEGF-Sekretion kommt (s. **Abb. 3**). Die Daten zeigen, dass diese VEGF-Sekretion etwa 48 h nach Infektion nachweisbar war. Damit konnte schon in fünf Zelllinien (HeLa, EA.hy, THP, MM6, MCF-7) eine Induktion von VEGF nach Infektion mit *B. henselae* nachgewiesen werden (Daten z.T. nicht publiziert)¹⁸¹.

4.1.2 Induktion weiterer angiogenetisch wirksamer Zytokine durch *B. henselae*

Schon früher wurde vermutet, dass die angioproliferativen Eigenschaften der Zellkulturüberstände infizierter Zellen nicht allein auf VEGF zurückgeführt werden können, sondern dass weitere Faktoren beteiligt sein müssen. Die Notwendigkeit zusätzlicher angioproliferativ wirkender Faktoren wurde indirekt in Experimenten belegt, in denen unter Zugabe von VEGF-neutralisierenden Antikörpern zu konditionierten Zellkulturüberständen die Endothelzell-Proliferation nur zu 50 % reduziert werden konnte⁹⁰. Neben der Annahme, dass *B. henselae*-getriggertes VEGF für etwa die Hälfte

der Wachstumsstimulation der Endothelzellen verantwortlich ist und somit den wohl wichtigsten angiogenetisch wirksamen Faktor in BA und PH darstellt, implizieren diese Ergebnisse, dass weitere angioproliferativ wirkende Zytokine für Endothelzell-Proliferation nötig sind. Diese Daten stehen in Einklang mit klinischen Studien, in denen gezeigt wurde, dass der alleinige Einsatz von VEGF zur Wachstumsstimulation von Kollateralgefäßen bei Patienten mit ischämischen Erkrankungen der Koronarien und der Extremitätengefäße nicht ausreichend war. Die Symptomatik der Patienten konnte nicht verbessert werden, und die neugebildeten Gefäße waren in der Mehrzahl der Fälle mit Ödemen assoziiert^{51,68}. Es wäre also denkbar, dass ein ‚angiogenetischer Cocktail‘ - bestehend aus einer Vielzahl angiogenetisch wirksamer Substanzen - bessere Resultate erzielen würde. So ist schon seit längerem bekannt, dass neben VEGF weitere Zytokine an der Angiogenese beteiligt sein müssen, um Endothelzellen zu stabilen, funktionsfähigen Gefäßen reifen zu lassen²².

Aufschluss über die weiteren mit der BA assoziierten angioproliferativ wirkenden Zytokine lieferten Gene-chip Experimente, die zeigten, dass in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae* nicht nur eine vermehrte VEGF-Geninduktion vorlag, sondern dass diese auch für u.a. IL-8, ADM und IGFBP-3 zu beobachten war (s. Anhang, **Tab. 1**). Von IL-8 ist schon seit längerem bekannt, dass es – neben seinen proinflammatorischen Eigenschaften – ein starker angiogenetischer Stimulus ist. IL-8 werden proliferative und chemotaktische Impulse auf HUVECs zugeschrieben⁹⁵. Weiterhin spielt in der Gefäßentwicklung und der Tumorangiogenese das vasodilatatorisch wirkende Zytokin ADM eine wichtige Rolle. ADM wird bei Entzündungen, in Tumorzellen und unter Hypoxie vermehrt exprimiert und besitzt direkt angiogenetische Eigenschaften^{26,129,177}. Eine Beteiligung von IGFBP-3 an der Angiogenese lässt sich anhand erst kürzlich veröffentlichter Daten vermuten, in denen gezeigt wurde, dass sich das Protein in proliferierenden Endothelzellen im murinen Mammakarzinom-Modell vermehrt nachweisen lässt¹⁵⁷.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche Konzentrationserhöhung aller dieser vier Zytokine (VEGF, IL-8, ADM, IGFBP-3) im Zellkulturüberstand von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae* nachgewiesen werden

(s. **Abb. 3 - 6**). Wie es auch bei der VEGF-Sekretion zu beobachten war, dauerte es vom Zeitpunkt der Infektion ca. 48 h bis eine signifikante Konzentration dieser Zytokine im Zellkulturüberstand messbar war. Somit konnten zum ersten Mal die angiogenetischen Zytokine, die an der Entstehung der *B. henselae* induzierten Endothelzell-Proliferationen beteiligt sein könnten, nachgewiesen werden. Damit scheint zur Entstehung von funktionsfähigem und langandauerndem Gefäßwachstum ein ganzer ‚Cocktail‘ von angiogenetisch wirkenden Substanzen erforderlich zu sein. Bestandteil dieses ‚Cocktails‘ im Krankheitsbild BA/PH könnten damit die beschriebenen vier Zytokine (VEGF, IL-8, ADM, IGFBP-3) sein. Neben diesen Zytokinen beobachtete man in den Gene-chip Experimenten nach Infektion mit *B. henselae* die verstärkte Induktion zweier weiterer Zytokine, denen eine Modulation der Angiogenese zugeschrieben wird: Ephrin A1 und Endothelin 2 (s. Anhang, **Tab. 1**). Ephrin A1 sowie sein Rezeptor EphA2 konnten schon in Endothelzellen verschiedenster menschlicher Tumoren nachgewiesen werden¹³⁰. Neben seinem vasokonstringierenden Effekt ist Endothelin 2 an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Angiogenese beteiligt. Das Zytokin konnte schon in Mammakarzinomen und in hypoxischen Arealen anderer solider Tumoren nachgewiesen werden⁶⁵.

Es ist anzumerken, dass die Messungen der Geninduktion nach Infektion mit *B. henselae* bislang nur zu einem Zeitpunkt (6 h nach Infektion) durchgeführt wurden. Somit besteht die Möglichkeit, weitere Zytokine mit angiogenetischer Potenz zu anderen Zeitpunkten nach Infektion mit *B. henselae* nachzuweisen. Derartige Arbeiten werden zur Zeit durchgeführt.

Sollte es möglich sein, anhand der Infektion mit *B. henselae* den ‚angiogenetischen Cocktail‘ näher zu charakterisieren, könnte dieses Modell für tieferes Verständnis für die Faktoren sorgen, die für suffizientes Gefäßwachstum essentiell sind. Dieses Wissen könnte man sich z.B. zur Therapie ischämischer Erkrankungen zu Eigen machen, um erfolgreich die bei alleinigem Einsatz von VEGF auftretenden Nebenwirkungen zu unterbinden^{51,68}.

4.2 Aktivierung von HIF-1 nach Infektion mit *B. henselae*

Die aus den Gene-chip Experimenten erhaltenen Daten zeigen nach Infektion mit *B. henselae* eindeutig ein HIF-1-dominiertes Genmuster. Die überwiegende Mehrzahl der induzierten Gene – insgesamt 14 Gene - werden bekanntermaßen direkt oder indirekt von dem Transkriptionsfaktor HIF-1 kontrolliert (s. Anhang, **Tab. 1**). Unter diesen befinden sich auch die angiogenetisch wirkenden Zytokine VEGF, ADM und IGFBP-3. Für den direkten Nachweis der Aktivierung von HIF-1 beschränkte man sich in vorliegender Arbeit auf die funktionell entscheidende α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors¹⁵⁰.

Tatsächlich war es 4 - 6 Stunden nach Infektion mit *B. henselae* möglich, HIF-1 α -Aktivierung mittels Western blot aus zellulären Extrakten nachzuweisen (s. **Abb. 9**). Somit ist in einem *in vitro* Modell der direkte Nachweis des Schlüssel-Transkriptionsfaktors der Angiogenese gelungen, der bei der Wirtszellreaktion nach Infektion mit *B. henselae* die möglicherweise entscheidende Rolle spielt. Neben dem Nachweis von HIF-1 α mittels Western blot wurde in einer Immunfluoreszenzfärbung 3 h nach Infektion mit *B. henselae* ebenfalls die Aktivierung von HIF-1 α nachgewiesen¹⁸⁵. Nach Vergleich mit der DAPI-Färbung ließ sich zudem die nukleäre Lokalisation von HIF-1 α darstellen (s. **Abb. 16**). Diese *in vitro* Ergebnisse deuten an, dass nach 3 h, dem Zeitpunkt der Fixierung der Färbung, eine Translokation von HIF-1 α in den Kern erfolgt war. Ähnliche Ergebnisse ließen sich *in vivo* aus Biopsaten von Patienten gewinnen, die an BA erkrankt waren⁹¹. Mittels HIF-1 Immunohistochemie (IHC) konnte dabei nukleär-lokalisiertes HIF-1 α v.a. in Zellen, die als Histiozyten und Makrophagen identifiziert wurden und die die Läsionen infiltrierten, nachgewiesen werden (s. Anhang, **Abb. 1**).

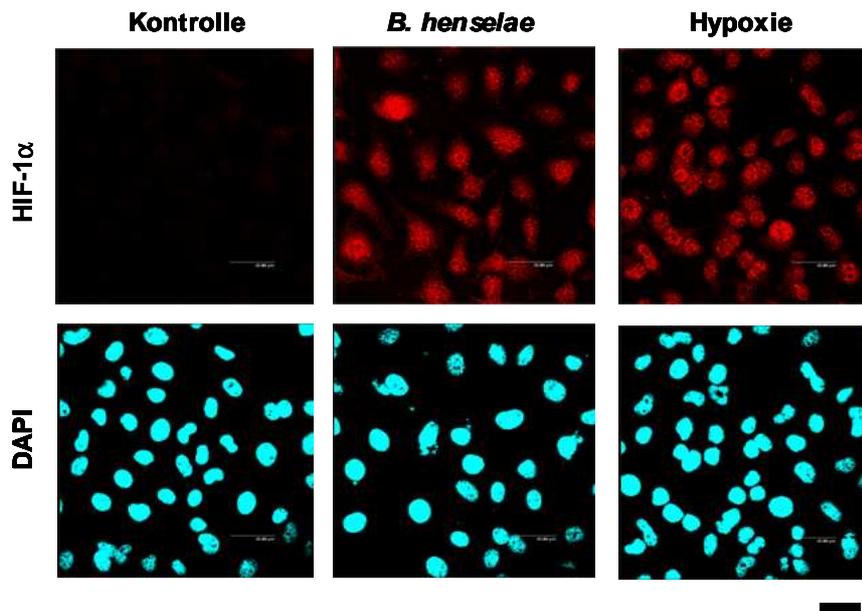


Abb. 16: Aktivierung von HIF-1 α in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*.

Detektion von HIF-1 α mittels Immunfluoreszenzfärbung. Die Zellen wurden 3 h mit *B. henselae* kokultiviert (MOI: 500) und anschließend mit einem anti-HIF-1 α Primär- und einem TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (obere Reihe). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (untere Reihe). Skalierung: 20 μ m. Daten entnommen aus ¹⁸⁵.

Diese Beobachtungen befinden sich in Einklang mit erst kürzlich veröffentlichten Resultaten, die zeigen, dass HIF-1 α im Gewebe verschiedenster Neoplasien, die mit gesteigerter Angiogenese assoziiert sind, aktiviert wird ^{18,191}. Ferner war es mittels *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) und VEGF-Reporterassays möglich, die Aktivierung von HIF-1 α sowie eine gesteigerte VEGF-Promotoraktivität nach Infektion mit *B. henselae* zu belegen ⁹¹. Zusammenfassend wurde so auf verschiedenen molekularen Ebenen *in vivo* und *in vitro* die Induktion von HIF-1 nach Infektion mit *B. henselae* nachgewiesen.

Für den direkten Nachweis des Transkriptionsfaktors HIF-1 mittels Western blot konnte ein Konzentrationsanstieg nach 3 h mit einem Maximum 4 - 6 h nach Infektion festgestellt werden. Dieses Ergebnis lässt sich mit dem Zeitpunkt der Induktion HIF-1 regulierter Gene (z.B. VEGF, ADM, IGFBP-3) in den Gene-chip Experimenten 6 h nach Infektion in Einklang bringen, da hierbei nicht die direkte

Messung des Transkriptionsfaktors, sondern die Messung der HIF-regulierten Gentranskription auf mRNA-Ebene erfolgte. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbungen und EMSA-Analysen ergab sich ein Zeitfenster der maximalen Induktion von HIF-1 von 3 bis 6 h nach Infektion mit *B. henselae*⁹¹. Ein Anstieg der Zytokinkonzentration von HIF-1-kontrollierten Proteinen (VEGF, ADM, IGFBP-3) konnte im Zellkulturüberstand mit einer Verzögerung von 24 h und einer stetigen Steigerung bis zu 72 h nach Infektion ermittelt werden (s. **Abb. 3 - 6**). Somit scheinen für die molekularen Zwischenschritte von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors bis zur Sekretion der Zytokine durch die Infektion mit *B. henselae* eine Zeitspanne von mindestens 20 h erforderlich zu sein. Passend dazu benötigte man in einem VEGF-Reporterassay eine Inkubationszeit von mindestens 24 h, um eine mehr als zweifache Induktion des VEGF-Promotors zu beobachten¹⁸⁵. Hiermit ergibt sich ein schlüssiges Bild des Zeitverlaufes der HIF-1-Aktivierung nach Infektion mit *B. henselae*, beginnend mit der Konzentrationserhöhung des Transkriptionsfaktors ca. 4 h nach Infektion, über die Transkription der mRNA (z.B. von VEGF) nach etwa 6 h bis zur Sekretion der Proteine 24 h nach Infektion.

In allen Experimenten zeigte sich übereinstimmend, dass das Niveau der HIF-1-Aktivierung oder dessen nachgeschaltete Aktivität unter Hypoxie deutlich höher war als im Vergleich zur Infektion mit *B. henselae*. Die intrazelluläre Konzentrationserhöhung von HIF-1 α erfolgt durch Hemmung seines Abbaus, indem die Enzyme, die HIF-1 α dem Proteasom zuführen, durch das Fehlen des Sauerstoffs in ihrer Aktivität inhibiert werden (s. **Kap. 1.2.5**). Weswegen Hypoxie einen anscheinend stärkeren Stimulus für die Induktion von HIF-1 als die Infektion mit *B. henselae* darstellt, könnte als Ursache haben, dass die Infektion mit *B. henselae* zu einer geringeren Senkung des zellulären Sauerstoffpartialdruckes führt als es unter hypoxischen Bedingungen der Fall ist. Ergebnisse der Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass die Infektion mit *B. henselae* zu hypoxischen Bedingungen in der infizierten Wirtszelle führt. Doch auch hier war das Ausmaß der hypoxischen Bedingungen nach Infektion mit *B. henselae* geringer als nach Hypoxie selbst⁹¹. Ob die Aktivierung von

HIF-1 nach Infektion mit *B. henselae* durch die Entstehung von Hypoxie hervorgerufen wird, oder ob der Erreger über andere Wege den Transkriptionsfaktor aktiviert, ist bislang noch unklar.

4.3 Aktivierung von HIF-1 in Folge bakterieller Infektionen

Tumorentstehung und Angiogenese wurden in der Vergangenheit nur selten in Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen diskutiert. Durch die Aufrechterhaltung chronischer Entzündungszustände sowie durch die Produktion von karzinogenen bakteriellen Metaboliten können Bakterien dennoch an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein. Ein gut dokumentiertes Beispiel des entzündlichen Mechanismus der Karzinogenese ist die Infektion der Magenschleimhaut mit *Helicobacter pylori*, die mit der Entstehung des Adenokarzinoms und des MALT (*mucosa associated lymphatic tissue*) - Lymphoms des Magens epidemiologisch eng verbunden ist¹⁹⁹. Da bakterielle Infektionen durch Antibiotika therapierbar sind, könnte die Identifikation von Bakterien als Ursache der malignen Entartung wichtige Optionen der Krebsprävention eröffnen. So konnte in Studien der Rückgang der durch *H. pylori* hervorgerufenen MALT-Lymphome nach Eradikation des Erregers nachgewiesen werden¹⁹⁶. Obwohl keine Hinweise auf eine mögliche maligne Entartung bei der Bazillären Angiomatose bestehen, kann auch sie durch Antibiotikagabe zum vollständigen Rückgang gebracht werden¹⁸⁶.

Im Zuge dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob außer *B. henselae* auch andere Bakterien fähig sind, HIF-1 zu aktivieren und angioproliferativ wirkende Faktoren zu induzieren. Die Ergebnisse zeigen, dass allein *B. henselae* in der Lage war, die Sekretion von VEGF zu induzieren. Weder *Y. enterocolitica* pYV⁺, *Y. enterocolitica* pYV⁻, *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv⁺ noch *L. pneumophila* konnten eine Sekretion des Wachstumsfaktors auslösen (s. **Abb. 13**). In anderen Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass *Streptococcus pneumoniae* und *Mycobacterium tuberculosis* fähig sind, in Makrophagen eine VEGF-Sekretion zu induzieren^{135,179}. Auch in Makrophagen von Patienten mit Spontaner Bakterieller Peritonitis wurde ein erhöhter VEGF-Level gemessen²⁷. Zusammengefasst lässt sich anhand dieser Daten schlussfolgern, dass sich die

Induktion von VEGF nicht auf eine spezielle Zelllinie und auch nicht auf die Interaktion einer einzelnen Bakteriengattung mit einer Wirtszelle beschränken lässt.

Im Gegensatz zu VEGF löste neben der Infektion mit *B. henselae* auch die Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁻ und *E. coli* HB 101 inv⁺ eine Sekretion von IL-8 in den Zellkulturüberstand aus (s. **Abb. 14**). Dass der Entzündungsmediator IL-8 durch Infektion mit diversen anderen Bakterien vermehrt sekretiert wird, war bereits bekannt. So nimmt z.B. *Y. enterocolitica* über Invasine Kontakt zu Wirtszellen auf und aktiviert anschließend via Aktivierung von p38 MAP-Kinase und JNK die NF-κB-vermittelte IL-8-Sekretion⁶⁴. Interessanterweise induziert auch *H. pylori*, der wie *B. henselae* über ein Typ IV-Sekretionssystem verfügt, IL-8, indem das Bakterium über besagtes Sekretionssystem das bakterielle Effektorprotein CagA in die eukaryontische Zelle transloziert und damit die Synthese und die Sekretion des Zytokins auslöst⁵⁵. Welche Rolle das Typ IV-Sekretionssystem bei der Induktion angiogenetischer Zytokine im Rahmen einer Infektion mit *B. henselae* spielt, ist bislang noch unklar.

Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1α nicht spezifisch durch *B. henselae* erfolgt. Auch die Infektionen mit *Y. enterocolitica* pYV⁺ und pYV⁻, *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv⁺ bewirken eine Aktivierung von HIF-1α (s. **Abb. 15**). Die Rolle von HIF in bakteriellen Infektionen wurde bislang nicht untersucht. Einzig indirekte Hinweise implizieren die Möglichkeit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors in Folge bakterieller Infektionen. Nach Infektion mit *Chlamydia trachomatis* wurde z.B. in Mikroarray-Analysen die vermehrte Expression verschiedener HIF-1-kontrollierter Gene, wie u.a. auch VEGF, beobachtet¹⁹⁷. In *in vitro* Experimenten wurde der von *Mycobacterium tuberculosis* sekretierte Eisen-Chelator Exochelin erfolgreich eingesetzt, um die zellulären HIF-1-Level zu erhöhen, indem der Eisen abhängige Abbau von HIF-1α gehemmt wurde²⁹. Bei all diesen aufgeführten Beispielen einer Aktivierung von HIF-1 ist deren biologische Rolle unklar; lediglich bei

B. henselae lässt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors eine Rolle bei der Angiogenese vermuten.

Von allen in dieser Arbeit verwendeten Bakterien war einzig *L. pneumophila* nicht in der Lage HIF-1 α zu induzieren; folglich konnte auch keine Sekretion von VEGF im Zellkulturüberstand gemessen werden (s. **Abb 13**). Auch *L. pneumophila* besitzt ein dem *B. henselae* verwandtes Typ IV-Sekretionssystem, das Dot/Icm System, das dem Bakterium das intrazelluläre Überleben in Vakuolen phagozytierender Zellen ermöglicht⁴ und für die Induktion der Apoptose von essentieller Bedeutung ist²⁰³. Es lässt sich vermuten, dass der Zelle durch das frühzeitige Absterben keine Zeit verbleibt, den Transkriptionsfaktor zu induzieren und Wachstumsfaktoren zu synthetisieren. Welche Rolle das Typ IV-Sekretionssystem bei der Infektion mit *B. henselae* spielt und warum die Infektion mit *B. henselae* im Gegensatz zu der von *L. pneumophila* in einer Hemmung des programmierten Zelltodes resultiert, ist weiterhin unklar.

4.3.1 Aktivierung von HIF-1 nach bakteriellen Infektionen: eine konservierte Reaktion der Zelle?

Aus den Daten lässt sich vermuten, dass die Aktivierung von HIF-1 keinesfalls einzigartig für eine Infektion mit *B. henselae* ist; vielmehr scheint die Aktivierung von HIF-1 eine konservierte Reaktion der Wirtszelle auf Infektionen mit bakteriellen Erregern darzustellen. Für diese These würde auch sprechen, dass VEGF neben seiner angioproliferativen Wirkung auch entzündliche Eigenschaften besitzt, die zu einer Lockerung der Endothelzellkontakte und zu einer Permeabilitätssteigerung der Gefäße führt¹⁶⁵. Einzigartig für die Infektion mit *B. henselae* scheint vielmehr die Aktivierung von HIF-1 und die über einen langen Zeitraum konstante Induktion von vaskuloproliferativen Zytokinen zu sein, in dessen Folge es zu der Proliferation der Endothelzellen kommt. Warum es nach Infektion mit den in dieser Arbeit verwendeten Bakterien (*Y. enterocolitica* pYV⁺ und pYV⁻, *E. coli* HB 101 und HB 101 inv⁺) nach Aktivierung von HIF-1 nicht zu einer Sekretion der von dem Transkriptionsfaktor kontrollierten Zytokine kam, könnte an der zytotoxischen Wirkung dieser

Bakterien liegen. Von pathogenen Yersinien ist bekannt, dass sie über eine Hemmung des NF- κ B-Signalweges zu einer Induktion der Apoptose in Makrophagen führen¹⁵². Ist es der infizierten Zelle bei hoher Virulenz des Erregers nicht möglich, die Infektion zu überleben, werden Stoffwechselfvorgänge eingeleitet, die letztendlich im Zelltod enden.

Im Gegensatz dazu kommt es nach Infektion mit *B. henselae* nicht zu einem Untergang der Wirtszelle. Vielmehr zeigten Studien, dass die durch *B. henselae* induzierten Endothelzellen-Proliferationen nicht ausschließlich auf einer gesteigerten Mitoserate beruhten, sondern dass auch ein hemmender Effekt des Bakteriums auf die Apoptose in Endothelzellen festgestellt werden konnte⁹³. Hierbei unterdrückt *B. henselae* sowohl frühe als auch spätere Vorgänge der Apoptose wie z.B. die Aktivität der Caspasen und die Fragmentierung der DNA (s. **Kap. 4.4**)⁸⁸. Der normalerweise von der Zelle eingeschlagene Weg der Apoptose als Reaktion auf bakterielle Infektionen wird auf diese Weise von *B. henselae* umgangen und kann als Pathomechanismus verstanden werden, um das Überleben der Zellen sicherzustellen und damit sich selbst letztendlich das bakterielle Habitat ‚Wirtszelle‘ zu erhalten.

4.4 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach Infektion mit *B. henselae*

Wie aus früheren Studien bekannt war, führt die Infektion mit *B. henselae* zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B⁵⁹. Weitere Hinweise auf eine Aktivierung von NF- κ B lieferten Gene-chip Experimente, die zeigten, dass das NF- κ B regulierte Zytokin IL-8 sowie dessen Sekretion in den Zellkulturüberstand nachweisbar war (s. **Abb. 4**). In der Arbeitsgruppe wurde übereinstimmend dazu mittels Immunfluoreszenz und EMSA die Aktivierung von NF- κ B direkt nachgewiesen¹⁸⁵. Unter Zugabe des NF- κ B-Inhibitors Parthenolid¹⁶⁷ konnte die NF- κ B regulierte Induktion von IL-8 im Vergleich zur HIF-1 regulierten VEGF-Induktion gehemmt werden (s. **Abb. 12**). Somit war es möglich, eine Trennung der Rollen der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und NF- κ B in Wirtszellen nach Infektion mit *B. henselae* aufzuzeigen: IL-8 wird demnach über NF- κ B kontrolliert, VEGF hingegen über HIF-1. Dass auch die VEGF-

Sekretion nach Inhibitorzugabe leicht abfiel, könnte auf die lange Inkubationszeit (72 h) und der damit vergesellschafteten Hemmung anderer, für die Zelle wichtiger Stoffwechselforgänge zurückzuführen sein. Warum sich unter all den in den Gene-chip Experimenten gefundenen und durch *B. henselae* induzierten Genen nur ein einziges NF- κ B-kontrolliertes Gen befindet, ist bislang unklar. Allerdings wurde bis jetzt nur ein einziger Zeitpunkt in den Gene-chip Experimenten (6 h nach Infektion) untersucht. Es wäre somit denkbar, dass zu anderen Zeitpunkten weitere NF- κ B-kontrollierte Gene induziert werden. Ergebnisse, die zeigen, dass das NF- κ B-kontrollierte Protein cIAP-2 (*cellular inhibitor of apoptosis protein*) in Mono Mac-Zellen nach *B. henselae*-Infektion exprimiert wird, weisen auf weitere NF- κ B-kontrollierte Gene nach Infektion mit *B. henselae* hin⁸⁸. Dass die Aktivierung von NF- κ B eine entscheidende Bedeutung der Wirtszellantwort auf eine Infektion mit *B. henselae* hat, deuten Studien an, in denen beschrieben wurde, dass die für eine Infektion mit *B. henselae* charakteristische Hemmung Apoptose-induzierender Zellvorgänge wahrscheinlich Folge einer Aktivierung von NF- κ B ist⁸⁸. In diesem Zusammenhang kann auch die Expression von cIAP-2 verstanden werden, das durch Bindung und potente Hemmung der Caspasen die Apoptose inhibiert (s. **Abb. 17**)¹⁸³. Die Apoptoseinhibition könnte man in dem Sinne verstehen, dass der im Laufe einiger Infektionen auftretende programmierte Zelltod umgangen wird und sich das Bakterium so seinen Lebensraum erhält. Ähnliches ist für *Chlamydia* spp. bereits bekannt⁵⁴.

4.5 Die Rolle der MAP-Kinasen an der Aktivierung von HIF-1

Es ist beschrieben worden, dass p42/p44 durch direkte Phosphorylierung von HIF-1 zu einer Steigerung der Transkriptionsaktivität von HIF-1 beiträgt⁹. Durch Hemmung von MEK1 (der der p42/p44 übergeordneten MAPKK) war es möglich, die Phosphorylierung und die Transkriptionsaktivität von HIF-1 herabzusetzen¹⁴². Der Nachweis, dass p42/p44 durch Hypoxie aktiviert wird und infolgedessen an der Aktivierung von HIF-1 beteiligt ist¹²⁴, deutet auf eine mögliche Beteiligung von p42/p44 an der *B. henselae*-induzierten Aktivierung von HIF-1 hin. Zum Nachweis der Beteiligung des p42/p44-MAP-Kinase-

Signaltransduktionsweges an der Induktion proangiogenetisch wirksamer Zytokine nach Infektion mit *B. henselae* wurde der MEK1-Inhibitor PD 98059 den HeLa-Zellen zugesetzt. Es konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der VEGF-Sekretion im Zellkulturüberstand festgestellt werden (s. **Abb. 11**). Dass neben der Sekretion von VEGF auch die von IL-8 gehemmt wurde, könnte eine Beteiligung von p42/p44 an der Aktivierung von mehreren Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B¹⁰⁸, andeuten. Nach Inhibitorzugabe war neben der Abnahme der Zytokinkonzentration (VEGF, IL-8) nach Infektion mit *B. henselae* auch eine Abnahme der Zytokinkonzentration der Negativkontrollen zu verzeichnen, so dass die Abnahme von VEGF und IL-8 nicht allein auf die Hemmung der Signaltransduktion durch den MEK1-Inhibitor nach Infektion mit *B. henselae* zurückzuführen ist. Vielmehr ist anzunehmen, dass durch die lange Inkubationszeit von bis zu 72 h auch andere für die Zelle wichtige Funktionen, die durch die p42/p44-MAP-Kinase vermittelt werden, gehemmt wurden und dass es so zu einer Beeinträchtigung der Sekretionsleistung der Zelle kam. Auch könnte die Zytotoxizität des Inhibitors PD 98059 zu einer verminderten Zytokinsekretion beitragen¹¹¹.

Ähnlich dem Ergebnis der Hemmung des p42/p44-Signaltransduktionsweges zeigte die Hemmung der p38-MAP-Kinase einen deutlichen konzentrationsabhängigen Abfall der VEGF- und der IL-8-Sekretion (s. **Abb. 10**). Wie der p42/p44-MAP-Kinase wird auch der p38-MAP-Kinase eine Rolle bei der Angiogenese zugeschrieben¹⁸⁹. Dabei wird über die Phosphorylierung des Histons H3 durch die p38-MAP-Kinase die NF- κ B-vermittelte Transkription des proangiogenetischen IL-8 erreicht¹⁵⁴. Zwar sind mRNA-stabilisierende Eigenschaften von p38 bekannt¹⁹⁴, doch muss noch genauer untersucht werden, welche Rolle der p38-MAP-Kinase bei der Aktivierung von HIF-1 zukommt. In jüngsten Experimenten der Arbeitsgruppe konnte mittels VEGF-Reporterassay unter Zugabe des p38-Inhibitors SB 202190 eine Hemmung der HIF-1-Aktivität nach Infektion mit *B. henselae* erreicht werden¹⁸⁵. Ferner war es mittels Western blots möglich, die phosphorylierte und somit aktivierte Form sowohl der p38-MAP-Kinase als auch der p42/p44-MAP-Kinase nach Infektion mit *B. henselae* nachzuweisen,

während die nicht-phosphorylierte, konstitutiv exprimierte und inaktive Form nicht durch eine *B. henselae*-Infektion reguliert wurde (s. Anhang, **Abb. 2**).

4.6 Das Oberflächenprotein *Bartonella* Adhäsion A (BadA)

4.6.1 Interaktion von BadA mit Komponenten der extrazellulären Matrix

B. henselae exprimiert an seiner Oberfläche ein ca. 340 kDa großes, nicht fimbrielles Adhäsionsmolekül (BadA), das wahrscheinlich mit dem ‚Typ IV-like-Pilus‘ von *B. henselae* identisch ist¹⁴⁶. BadA scheint für die Bindung von *B. henselae* an Fibronectin (Fn) von großer Bedeutung zu sein, da das Fehlen von BadA bei *B. henselae* zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit an Fn führte¹⁴⁷. Resultate dieser Arbeit belegen, dass die Bindungsfähigkeit von *B. henselae* BadA⁻ an Kollagen - ein weiterer wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix – deutlich vermindert ist (s. **Abb. 8**). Ähnlich wie bei der Pilus-negativen Spontanvariante adhärirten deutlich geringere Mengen von *B. henselae* BadA⁻ an den Kollagen-beschichteten Coverslips. Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass BadA identisch mit dem ‚Typ IV-like-Pilus‘ von *B. henselae* ist.

4.6.2 Die Rolle von BadA an der Induktion angiogenetisch wirksamer Zytokine

Dass die Kollagenbindungsfähigkeit von *B. henselae* BadA⁻ deutlich vermindert war, ließ vermuten, dass das Oberflächenmolekül auch eine Rolle bei der Adhärenz von *B. henselae* an Wirtszellen spielt. In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, dass im Vergleich zum Wildtyp *B. henselae* BadA⁻ keine Induktion der angiogenetisch wirksamen Zytokine VEGF, IL-8, IGFBP-3 und ADM bewirkt. Diese Zytokine konnten nach Infektion mit *B. henselae* BadA⁻ gar nicht oder nur in geringem Masse im Zellkulturüberstand von HeLa-Zellen detektiert werden (s. **Abb. 7**). Neben der verminderten Sekretion angiogenetisch wirkender Zytokine nach Infektion mit *B. henselae* BadA⁻ stellte sich zudem heraus, dass die BadA-defiziente Mutante in VEGF-Reporterassays im Vergleich zum Wildtyp zu keiner HIF-Aktivierung führte¹⁸⁵. Die komplementierte BadA⁻-Mutante (BadA⁻/BadA⁺WT) war wiederum in der Lage, den VEGF-Promotor zu

induzieren. Ebenso wie *B. henselae* BadA⁻ wies auch *B. henselae* Pil⁻ im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Fähigkeit zur HIF-Aktivierung und zur Induktion der VEGF-Promotoraktivität auf.

All diese Ergebnisse lassen auf eine Schlüsselfunktion von BadA an der Interaktion von *B. henselae* mit der Wirtszelle schließen. Inwieweit der Invasionsprozess des Erregers in Wirtszellen durch das Fehlen von BadA gehemmt wird, ist bislang unklar. Durch das Fehlen dieses wichtigen Oberflächenmoleküls lässt sich die Adhärenz von *B. henselae* an Wirtszellen deutlich reduzieren und weitere Folgeaktionen einer *Bartonella*-Infektion in der Wirtszelle (HIF-Aktivierung, Sekretion angiogenetischer Zytokine) werden unterbunden. Ob BadA einzig für den Kontakt des Bakteriums mit der Wirtszelle verantwortlich ist oder ob dem Oberflächenmolekül eigene angiogenetische Potenzen zukommen, bedarf weiterer Untersuchungen. Denkbar wäre auch, dass die BadA-vermittelte Adhärenz von *B. henselae* an Wirtszellen die funktionelle Basis für die Modulation der Wirtszellantwort über das Typ IV-Sekretionssystem von *B. henselae* darstellt, über das bislang noch unbekannte Proteine in die Zellen eingeschleust werden könnten ^{132,158,166}.

Neben *B. henselae* aktiviert auch *Y. enterocolitica* pYV⁺ HIF-1 α in dem hier benutzten *in vitro* Infektionsmodell (s. **Abb. 15**). *Y. enterocolitica* pYV⁺ besitzt das zu BadA (340 kDa) strukturell homologe Oberflächenmolekül YadA (43 kDa), das neben der hemmenden Wirkung auf das Komplementsystem fähig ist, an vielfältige Strukturen der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagen und Fn zu binden ⁷². Sowohl YadA als auch BadA sind aus einem Kopf, einer Hals-Region, einem Stiel und einem Membrananker aufgebaut. Studien zeigten, dass YadA für die Adhäsion des Bakteriums an der Wirtszelle von essentieller Bedeutung ist ⁴⁷. Die Beobachtung, dass nach Zugabe von Antikörpern gegen Fibronectin die Invasion blockiert werden konnte, deutet an, dass die Invasion auf eine von der extrazellulären Matrix abhängigen Bindung zwischen YadA und Wirtszelle beruht ⁴⁶. Die Tatsache, dass beide Bakterien ein funktionell sowie strukturell ähnliches Oberflächenmolekül besitzen und die Infektion beider Bakterien in einer Aktivierung von HIF-1 resultiert, lässt vermuten, dass dem Protein eine Rolle in der Induktion von HIF-1 zukommt. Auf welchem Wege

es nach Interaktion des Oberflächenmoleküls mit der Wirtszelle zu einem Anstieg von HIF-1 α kommt, ist bislang unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Allerdings lässt sich die Aktivierung von HIF-1 nicht ausschließlich auf das Vorhandensein von nicht-fimbriellen Adhäsinen (z.B. BadA, YadA) zurückführen, da auch nach Infektion mit *Y. enterocolitica* pYV⁻, *E. coli* HB 101 und *E. coli* HB 101 inv⁺, die allesamt nicht über ein dem BadA ähnliches Adhäsionsmolekül verfügen, eine Aktivierung von HIF-1 festzustellen war (s. **Abb. 15**). Es lässt sich vermuten, dass im Verlauf der bakteriellen Infektion der Transkriptionsfaktor HIF-1 aktiviert wird, um den gesteigerten Energieverbrauch der Zelle über die Induktion eines HIF-1 regulierten Genmusters aufzufangen. Zumindest für *B. henselae* scheint diese Hypothese zutreffend⁹¹.

4.7 Die Rolle des *B. henselae*-induzierten angiogenetischen Cocktails im ‚paracrine loop model‘

Die in dieser Arbeit erworbenen Ergebnisse über eine durch *B. henselae* induzierte Zytokinsekretion fügen sich in das schon früher formulierte hypothetische Modell, nach dem sich *B. henselae* seinen eigenen Lebensraum selbst gestaltet⁸⁹. Dieses sogenannte ‚paracrine loop model‘ orientiert sich am Pathomechanismus des Pflanzen-pathogenen *Agrobacterium tumefaciens*, das phylogenetisch mit *B. henselae* eng verwandt ist^{30,117}. *A. tumefaciens* ruft die sog. Wurzelhalsgalle, einen vaskulären Pflanzentumor, hervor. Dazu schleust es über sein Typ IV-Sekretionssystem ein Tumor-induzierendes Plasmid (Ti-Plasmid) in die Pflanzenzelle ein. Nachdem die transferierte Tumor-induzierende-DNA (T-DNA) im Wirtsgenom stabil integriert wurde, resultiert die Expression der für Zytokine und Auxine kodierenden Gene in der neoplastischen Transformation der Pflanzenzellen. Die Wurzelhalsgalle zeichnet sich durch die Produktion von Tumor-spezifischen Substraten, den sog. Opinen, aus, die zwar von *A. tumefaciens*, nicht aber von anderen Mikroorganismen metabolisiert werden können⁷⁴. Somit schafft sich *A. tumefaciens* über die Proliferation der Wirtszelle und die nachfolgende Nährstoffproduktion ein dem Bakterium geeignetes Umfeld.

Ähnlich zu *A. tumefaciens* schafft sich auch *B. henselae* sein Habitat (s. **Abb. 17**). Im Zuge der Infektion moduliert das Bakterium die Wirtszelle in der Weise, dass es zu einer Sekretion von angioproliferativen Substanzen kommt. In vorliegender Arbeit konnten diese Substanzen nun näher charakterisiert werden. Es handelt sich hierbei u.a. um VEGF, IL-8, ADM und IGFBP-3. Auch der Nachweis des Transkriptionsfaktors HIF-1 in HeLa-Zellen als Schlüsselregulator der Angiogenese fügt sich in das Modell einer Stimulation des pathologischen Gefäßwachstums. Im nächsten Schritt des ‚paracrine loop models‘ kommt es dann durch die sekretierten angiogenetisch wirksamen Zytokine zu einer Proliferation der Endothelzellen. Mittels konfokaler Laserscanmikroskopie wurde gezeigt, dass *B. henselae* in hohem Maße an Endothelzellen adhäriert und diese auch invadiert. Im Gegensatz dazu konnte nur eine geringe Adhärenz der Bakterien an HeLa-Zellen festgestellt werden (Kempf, nicht publiziert)⁸⁹. *B. henselae* scheint demnach die nicht-endothelialen Zellen zur Synthese der angiogenetischen Zytokine nutzen zu können, während die Endothelzelle ein günstiges Habitat für die eigentliche Replikation von *B. henselae* darstellt.

Welche Rolle das Typ IV-Sekretionssystem in der *B. henselae*-Infektion spielt, ist noch unklar. Bislang konnte nur nachgewiesen werden, dass die Interaktion des Bakteriums mit Endothelzellen zu einer Aktivierung dieses Systems führte¹⁵⁸. Es liegen bei *B. henselae* weder Hinweise auf einen DNA-Transfer vor, noch konnte nachgewiesen werden, ob bakterielle DNA in das Wirtsgenom integriert wird. Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass sich die durch *B. henselae* hervorgerufenen vaskuloproliferativen Tumore nach Eradikation des Erregers mittels Antibiotika vollständig rückbilden und es nicht zu einer malignen Transformation der Wirtszelle kommt¹⁸⁶.

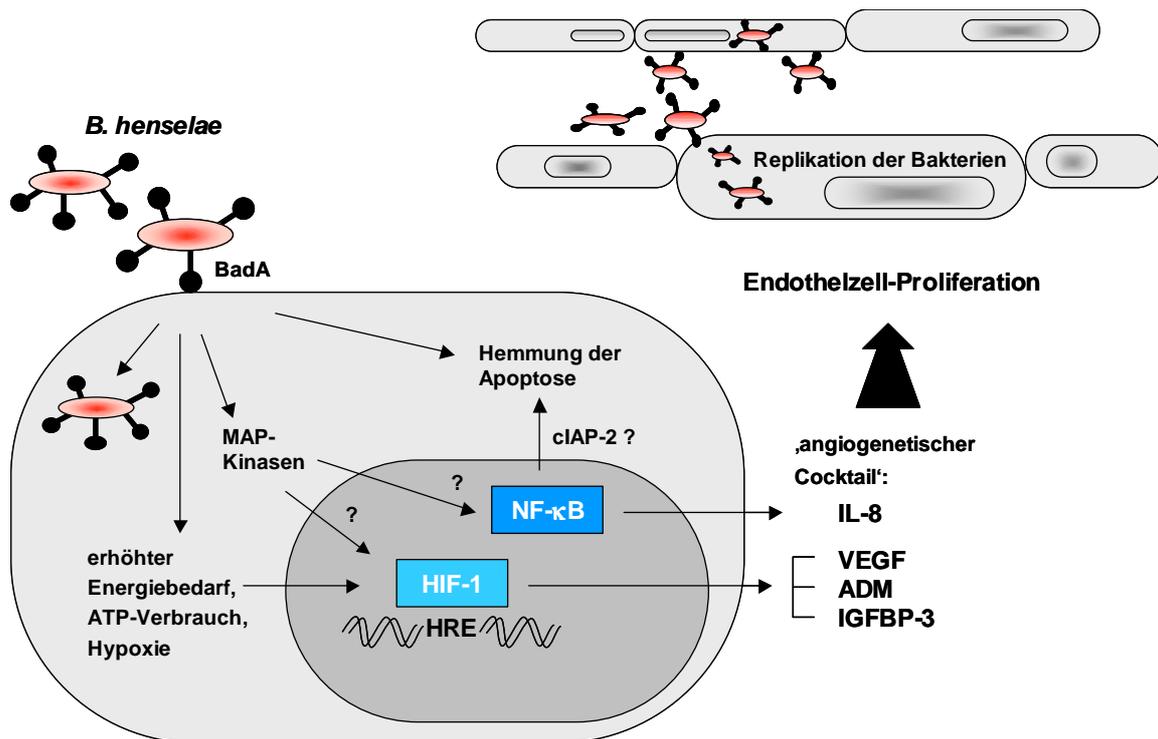


Abb. 17: Hypothetisches Modell der Induktion von Angiomatose durch *B. henselae*.

B. henselae adhärert via BadA an Wirtszellen; ein Teil der Bakterien invadiert die Zellen. *B. henselae* inhibiert nach Infektion die Apoptose. Dies geschieht möglicherweise mittels NF- κ B-vermittelter Aktivierung von cIAP-2⁸⁸. Die Infektion resultiert in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1. Auf welche Weise es zu der Aktivierung von HIF-1 kommt, ist bislang noch nicht abschließend geklärt; möglicherweise spielen die MAP-Kinasen p38 bzw. p42/p44 eine Rolle. Auch könnte der gesteigerte Energiebedarf der Wirtszelle im Zuge der Infektion und der resultierende ATP-Verbrauch sowie die eintretende Hypoxie die Zelle veranlassen, den Transkriptionsfaktor zu induzieren, um eine bessere Energieversorgung der Zelle zu gewährleisten. Letztendlich führt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und NF- κ B zu einer Sekretion angiogenetisch wirkender Substanzen (VEGF, IL-8, ADM und IGFBP-3). Dieser ‚angiogenetische Cocktail‘ seinerseits regt Endothelzellen zur Proliferation an. Die proliferierenden Endothelzellen werden anschließend von *B. henselae* infiziert und dienen den Bakterien als bevorzugtes Habitat. ADM: Adrenomedullin, ATP: Adenosin-5'-Triphosphat, BadA: *Bartonella* Adhäsion A, cIAP: *cellular inhibitor of apoptosis protein*, HIF: *hypoxia-inducible factor*, HRE: *hypoxia response element*, IL-8: Interleukin-8, IGFBP-3: *insulin-like growth factor binding protein-3*, MAP-Kinase: *mitogen-activated protein-kinase*, NF- κ B: *nuclear factor- κ B*, VEGF: *vascular endothelial growth factor*

4.8 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die Infektion mit *B. henselae* in einer Induktion von HIF-1 resultiert. In einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte in einem *in vivo* Experiment gezeigt werden, dass Endothelzellen nach Infektion mit *B. bacilliformis* die VEGF-Rezeptoren 1 (flt-1) und 2 (KDR), die bekanntlich durch HIF-2 reguliert werden¹⁶³, vermehrt exprimieren²⁸. Zusammen mit bekannten Resultaten lassen diese Ergebnisse die Vermutung zu, dass der durch *B. henselae* hervorgerufene Prozess der pathologischen Angiomatose auf einem mehrstufigen Mechanismus beruht: zum einen induziert *B. henselae* in Epithelzellen oder Makrophagen über die Aktivierung von HIF-1 eine gesteigerte VEGF-Sekretion, zum anderen werden in Endothelzellen, den Zielzellen von *Bartonella* spp., über die Aktivierung von HIF-2 vermehrt VEGF-Rezeptoren exprimiert. Die erhöhte Rezeptorzahl lässt die Endothelzellen für den über VEGF vermittelten Wachstumsimpuls empfänglicher werden. Dies würde zu einer zusätzlichen Verstärkung des ‚angiogenetischen Cocktails‘ im ‚paracrine loop model‘ führen⁸⁹, und könnte erklären, warum es nach Infektion mit *B. henselae* zu einer solch exzessiven Proliferation von Endothelzellen (BA, PH) kommt.

Die Erkenntnis, dass Bakterien oder deren bakterielle Bestandteile fähig sind, Gefäßproliferationen auszulösen, liefert ein mögliches Forschungsfeld, um ein tieferes Verständnis der Angiogeneseprozesse zu erlangen. Bislang lieferte der alleinige Einsatz von VEGF zur Stimulation des Gefäßwachstums bei chronisch ischämischen Erkrankungen eher enttäuschende Ergebnisse^{51,68}. Stabile Gefäße scheinen auf eine wohldosierte Mischung an angiogenetisch wirksamen Substanzen angewiesen zu sein²². So könnte die Analyse des durch *B. henselae* induzierten ‚angiogenetischen Cocktails‘ Aufschluss über Faktoren liefern, die für funktionelles Gefäßwachstum nötig sind. Die therapeutische Aktivierung von HIF-1 über bakterielle Faktoren von *B. henselae* könnte somit einen kompletten ‚angiogenetischen Cocktail‘ zur Therapie ischämischer Erkrankungen darstellen. In Pilotexperimenten lieferten Versuche mit ‚angiogenetischen Cocktails‘ bereits vielversprechende Ergebnisse: die Gefäße waren stabil und nicht mit Ödemen assoziiert⁴⁸.

Sollte sich in weiteren Versuchen herausstellen, dass einzelne bakterielle Bestandteile, wie z.B. BadA für die Induktion angiogenetisch wirksamer Substanzen alleine verantwortlich sein könnten, so könnte der Einsatz dieser Substanzen neue therapeutische Behandlungskonzepte chronisch ischämischer Erkrankungen liefern.

5 Zusammenfassung

Infektionen mit *Bartonella henselae* resultieren in vaskuloproliferativen Erkrankungen wie der Bazillären Angiomatose oder der Peliosis hepatis. Beide sind durch pathologische Angiogenese mit exzessiver Proliferation von Endothelzellen charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, auf welchem Weg eine Infektion mit *B. henselae* in Wirtszellen die Sekretion angioproliferativ wirkender Zytokine auslöst. Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *B. henselae* in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 resultiert. Des Weiteren wurde die Signaltransduktionskette, die zu der Aktivierung von HIF-1 führte, näher charakterisiert. Zusätzlich wurde die Rolle des Oberflächenmoleküls BadA in der Induktion einer vaskuloproliferativen Wirtszellantwort analysiert. Weiterhin sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, ob die Aktivierung von HIF-1 einzig bei einer Infektion mit *B. henselae* auftritt oder ob es auch in Folge von Infektionen verschiedener anderer Bakterien zu einer Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors kommt.

Die vorliegende Arbeit lieferte folgende Ergebnisse:

1. Die Infektion von HeLa-Zellen mit *B. henselae* führte zu einem Konzentrationsanstieg der proangiogenetischen Zytokine VEGF, IL-8, ADM und IGFBP-3 im Zellkulturüberstand.
2. Eine Infektion mit *B. henselae* resultierte in einer Aktivierung von HIF-1 (nachgewiesen mittels Western blot).
3. Eine Infektion mit verschiedenen anderen Bakterien (*Y. enterocolitica* pYV⁺, *Y. enterocolitica* pYV⁻, *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv⁺) resultierte ebenfalls in einer Aktivierung von HIF-1.
4. VEGF wurde einzig von *B. henselae* über einen Zeitraum von 72 h konstant sekretiert, während die Sekretion von IL-8 auch von anderen

Bakterien (*Y. enterocolitica* pYV⁻ und *E. coli* HB 101 inv⁺) induziert wurde.

5. Die MAP-Kinasen p38 sowie p42/p44 scheinen an der Induktion proangiogenetisch wirksamer Zytokine beteiligt zu sein, da die Hemmung der p38 und p42/p44 vermittelten Signaltransduktionswege zu einer verminderten Zytokinsekretion von VEGF und IL-8 führte.
6. Die Sekretion von NF- κ B reguliertem IL-8 ließ sich im Gegensatz zu dem HIF-1 reguliertem VEGF durch einen NF- κ B-Inhibitor hemmen.
7. Die Expression von BadA ist entscheidend für die Auslösung einer proangiogenetischen Wirtszellantwort, da die Infektion mit *B. henselae* BadA⁻ in HeLa-Zellen zu keiner Sekretion der proangiogenetisch wirksamen Zytokine VEGF, IL-8, ADM und IGFBP-3 führte.
8. Das Fehlen des Oberflächenmoleküls BadA führte bei *B. henselae* zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit an Kollagen.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte belegt werden, dass die Infektion mit *B. henselae* zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 führt, der bislang fast ausschließlich im Zusammenhang mit der Tumorangio-genese diskutiert wurde. Es stellte sich weiterhin heraus, dass verschiedene andere Bakterien, die zwar entzündliche, aber keine vaskuloproliferativen Krankheitsbilder hervorrufen, ebenfalls in der Lage sind, in der Wirtszelle HIF-1 zu aktivieren.

Durch weitere Analyse der Signalwege nach Infektion mit *B. henselae* konnte ein Beitrag zum Verständnis der durch das Bakterium induzierten pathologischen Angiogenese geleistet werden. Weiterhin lassen sich anhand dieser Ergebnisse tiefere Einblicke in den Prozess der Angiogenese gewinnen, die möglicherweise therapeutische Optionen für die Induktion bzw. Modulation der Angiogenese beinhalten.

6 Literaturverzeichnis

1. **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.
2. **Anderson, B., K. Sims, R. Regnery, L. Robinson, M. J. Schmidt, S. Goral, C. Hager, and K. Edwards.** 1994. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**:942-948.
3. **Anderson, B. E. and M. A. Neuman.** 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:203-219.
4. **Andrews, H. L., J. P. Vogel, and R. R. Isberg.** 1998. Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect. Immun.* **66**:950-958.
5. **Bais, C., B. Santomasso, O. Coso, L. Arvanitakis, E. G. Raaka, J. S. Gutkind, A. S. Asch, E. Cesarman, M. C. Gershengorn, E. A. Mesri, and M. C. Gerhengorn.** 1998. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* **391**:86-89.
6. **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.
7. **Benjamin, L. E., D. Golijanin, A. Itin, D. Pode, and E. Keshet.** 1999. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J. Clin. Invest.* **103**:159-165.
8. **Berger, T. G. and J. E. Koehler.** 1993. Bacillary angiomatosis. *AIDS Clin. Rev.* 43-60.
9. **Berra, E., J. Milanini, D. E. Richard, M. Le Gall, F. Vinals, E. Gothie, D. Roux, G. Pages, and J. Pouyssegur.** 2000. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem. Pharmacol.* **60**:1171-1178.
10. **Bibb, W. F., P. M. Arnow, D. L. Dellinger, and S. R. Perryman.** 1983. Isolation and characterization of a seventh serogroup of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* **17**:346-348.
11. **Boudier, H. A.** 1999. Arteriolar and capillary remodelling in hypertension. *Drugs* **58 Spec No 1**:37-40.

12. **Boyer, H. W. and D. Roulland Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472.
13. **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.
14. **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.
15. **Brouqui, P., B. Lascola, V. Roux, and D. Raoult.** 1999. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N. Engl. J. Med.* **340**:184-189.
16. **Bruick, R. K. and S. L. McKnight.** 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**:1337-1340.
17. **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.
18. **Burke, B., N. Tang, K. P. Corke, D. Tazzyman, K. Ameri, M. Wells, and C. E. Lewis.** 2002. Expression of HIF-1alpha by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J. Pathol.* **196**:204-212.
19. **Caniza, M. A., D. L. Granger, K. H. Wilson, M. K. Washington, D. L. Kordick, D. P. Frush, and R. B. Blitchington.** 1995. *Bartonella henselae*: etiology of pulmonary nodules in a patient with depressed cell-mediated immunity. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1505-1511.
20. **Cannon, J. G., R. G. Tompkins, J. A. Gelfand, H. R. Michie, G. G. Stanford, J. W. Van der Meer, S. Endres, G. Lonnemann, J. Corsetti, B. Chernow, and .** 1990. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J. Infect. Dis.* **161**:79-84.
21. **Carithers, H. A.** 1985. Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. *Am. J. Dis. Child.* **139**:1124-1133.
22. **Carmeliet, P.** 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* **9**:653-660.

23. **Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy.** 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**:435-439.
24. **Carmeliet, P. and R. K. Jain.** 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407** :249-257.
25. **Carmeliet, P., L. Moons, A. Lutun, V. Vincenti, V. Compernelle, M. De Mol, Y. Wu, F. Bono, L. Devy, H. Beck, D. Scholz, T. Acker, T. DiPalma, M. Dewerchin, A. Noel, I. Stalmans, A. Barra, S. Blacher, T. Vandendriessche, A. Ponten, U. Eriksson, K. H. Plate, J. M. Foidart, W. Schaper, D. S. Charnock-Jones, D. J. Hicklin, J. M. Herbert, D. Collen, and M. G. Persico.** 2001. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* **7**:575-583.
26. **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.
27. **Cejudo-Martin, P., J. Ros, M. Navasa, J. Fernandez, G. Fernandez-Varo, L. Ruiz-del-Arbol, F. Rivera, V. Arroyo, J. Rodes, and W. Jimenez.** 2001. Increased production of vascular endothelial growth factor in peritoneal macrophages of cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* **34**:487-493.
28. **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.
29. **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.
30. **Christie, P. J. and J. P. Vogel.** 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **8**:354-360.
31. **Cockerell, C. J., P. R. Bergstresser, C. Myrie-Williams, and P. M. Tierno.** 1990. Bacillary epithelioid angiomatosis occurring in an immunocompetent individual. *Arch. Dermatol.* **126**:787-790.

32. **Cockerell, C. J., M. A. Whitlow, G. F. Webster, and A. E. Friedman-Kien.** 1987. Epithelioid angiomatosis: a distinct vascular disorder in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *Lancet* **2**:654-656.
33. **Cooper, T. G.** 1981. *Biochemische Arbeitsmethoden*. Gruyter, Berlin.
34. **Cuttitta, F., R. Pio, M. Garayoa, E. Zudaire, M. Julian, T. H. Elsasser, L. M. Montuenga, and A. Martinez.** 2002. Adrenomedullin functions as an important tumor survival factor in human carcinogenesis. *Microsc. Res. Tech.* **57**:110-119.
35. **Daly, J. S., M. G. Worthington, D. J. Brenner, C. W. Moss, D. G. Hollis, R. S. Weyant, A. G. Steigerwalt, R. E. Weaver, M. I. Daneshvar, and S. P. O'Connor.** 1993. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **31**:872-881.
36. **Davis, R. J.** 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **268**:14553-14556.
37. **Davis, R. J.** 1994. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* **19**:470-473.
38. **de la Torre, J. C.** 2002. Alzheimer's disease: how does it start? *J. Alzheimers. Dis.* **4**:497-512.
39. **Dehio, C.** 1999. Interactions of *Bartonella henselae* with vascular endothelial cells. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:78-82.
40. **Del Prete, R., D. Fumarola, L. Fumarola, V. Basile, A. Mosca, and G. Miragliotta.** 1999. Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with suspected cat scratch disease (CSD) in Italy. *Eur. J. Epidemiol.* **15**:583-587.
41. **Desbaillets, I., A. C. Diserens, N. Tribolet, M. F. Hamou, and E. G. Van Meir.** 1997. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J. Exp. Med.* **186**:1201-1212.
42. **Dor, Y., R. Porat, and E. Keshet.** 2001. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**:C1367-C1374.
43. **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.

44. **Drancourt, M. and D. Raoult.** 1993. Proposed tests for the routine identification of *Rochalimaea* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**:710-713.
45. **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**:97-132.
46. **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.
47. **el Tahir, Y. and M. Skurnik.** 2001. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:209-218.
48. **Elson, D. A., G. Thurston, L. E. Huang, D. G. Ginzinger, D. M. McDonald, R. S. Johnson, and J. M. Arbeit.** 2001. Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev.* **15**:2520-2532.
49. **Endres, S., J. W. Van der Meer, and C. A. Dinarello.** 1987. Interleukin-1 in the pathogenesis of fever. *Eur. J. Clin. Invest* **17**:469-474.
50. **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.
51. **Ferrara, N. and K. Alitalo.** 1999. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat. Med.* **5**:1359-1364.
52. **Ferrara, N. and T. Davis-Smyth.** 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18**:4-25.
53. **Ferrara, N. and W. J. Henzel.** 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**:851-858.
54. **Fischer, S. F., C. Schwarz, J. Vier, and G. Hacker.** 2001. Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect. Immun.* **69**:7121-7129.

55. **Fischer, W., J. Puls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, and R. Haas.** 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol. Microbiol.* **42**:1337-1348.
56. **Folkman, J.** 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**:27-31.
57. **Folkman, J. and C. Haudenschild.** 1980. Angiogenesis in vitro. *Nature* **288**:551-556.
58. **Folkman, J. and Y. Shing.** 1992. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**:10931-10934.
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. **Fumarola, D., G. Giuliani, and S. Pece.** 1996. Pathogenic mechanisms of *Bartonella henselae* infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **15**:385-386.
61. **Gille, H., M. Kortenjann, O. Thomae, C. Moomaw, C. Slaughter, M. H. Cobb, and P. E. Shaw.** 1995. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J.* **14**:951-962.
62. **Gille, H., A. D. Sharrocks, and P. E. Shaw.** 1992. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* **358**:414-417.
63. **Golden, S. E.** 1993. Hepatosplenic cat-scratch disease associated with elevated anti-*Rochalimaea* antibody titers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **12**:868-871.
64. **Grassl, G. A., M. Kracht, A. Wiedemann, E. Hoffmann, M. Aepfelbacher, C. v.Eichel-Streiber, E. Bohn, and I. B. Autenrieth.** 2003. Activation of NF- κ B and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. *Cell. Microbiol.* **5**:957-971.
65. **Grimshaw, M. J., J. L. Wilson, and F. R. Balkwill.** 2002. Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *Eur. J. Immunol.* **32**:2393-2400.
66. **Harrison, T. G. and N. Doshi.** 1999. Serological evidence of *Bartonella* spp. infection in the UK. *Epidemiol. Infect* **123**:233-240.

67. **Heesemann, J.** 1987. Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. FEMS Microbiol. Lett. **48**:229-233.
68. **Henry, T. D., B. H. Annex, G. R. McKendall, M. A. Azrin, J. J. Lopez, F. J. Giordano, P. K. Shah, J. T. Willerson, R. L. Benza, D. S. Berman, C. M. Gibson, A. Bajamonde, A. C. Rundle, J. Fine, and E. R. McCluskey.** 2003. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. Circulation **107**:1359-1365.
69. **Hewitson, K. S., L. A. McNeill, M. V. Riordan, Y. M. Tian, A. N. Bullock, R. W. Welford, J. M. Elkins, N. J. Oldham, S. Bhattacharya, J. M. Gleadle, P. J. Ratcliffe, C. W. Pugh, and C. J. Schofield.** 2002. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. J. Biol. Chem. **277**:26351-26355.
70. **Higgins, J. A., S. Radulovic, D. C. Jaworski, and A. F. Azad.** 1996. Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (Siphonaptera:Pulicidae). J. Med. Entomol. **33**:490-495.
71. **Hill, C. S. and R. Treisman.** 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. Cell **80**:199-211.
72. **Hoiczky, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann.** 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. EMBO J. **19**:5989-5999.
73. **Hood, J. D. and D. A. Cheresh.** 2002. Role of integrins in cell invasion and migration. Nat. Rev. Cancer **2**:91-100.
74. **Hooykaas, P. J. J. and Beijersbergen, A. G. M.** 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. Annu. Rev. Phytopathol. **32**: 157-179.
75. **Hynes, R. O.** 2002. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. Nat. Med. **8** :918-921.
76. **Ibelgrafts, H.** 1999. COPE - Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia.
77. **Ivan, M., K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane, and W. G. Kaelin, Jr.** 2001. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. Science **292**:464-468.
78. **Jaakkola, P., D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe.** 2001.

- Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**:468-472.
79. **Jackson, L. A., B. A. Perkins, and J. D. Wenger.** 1993. Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am. J. Public Health* **83**:1707-1711.
80. **Jain, R. K.** 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* **9**:685-693.
81. **Janknecht, R., W. H. Ernst, V. Pingoud, and A. Nordheim.** 1993. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J.* **12**:5097-5104.
82. **Jeong, H. J., H. S. Chung, B. R. Lee, S. J. Kim, S. J. Yoo, S. H. Hong, and H. M. Kim.** 2003. Expression of proinflammatory cytokines via HIF-1alpha and NF-kappaB activation on desferrioxamine-stimulated HMC-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**:805-811.
83. **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.
84. **Kano, H., M. Kohno, K. Yasunari, K. Yokokawa, T. Horio, M. Ikeda, M. Minami, T. Hanehira, T. Takeda, and J. Yoshikawa.** 1996. Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.* **14**:209-213.
85. **Karin, M. and T. Hunter.** 1995. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* **5**:747-757.
86. **Karkkainen, M. J., T. Makinen, and K. Alitalo.** 2002. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell Biol.* **4**:E2-E5.
87. **Kato, H., M. Shichiri, F. Marumo, and Y. Hirata.** 1997. Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. *Endocrinology* **138**:2615-2620.
88. **Kempf, A. J. V., A. Schairer, D. Neumann, G. A. Grassl, M. Lebidziejewski, M. Schaller, P. Kyme, S. Wesselborg, and I. B. Autenrieth.** 2004. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in mono mac 6 cells. (eingereicht zur Publikation).

89. **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.
90. **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.
91. **Kempf, V. A. J., M. Lebidziejewski, K. Alitalo, J-H. Wälzlein, U. Ehehalt, J. Fiebig, B. Schütt, Sander C., S. Müller, G. Grassl, B. Brem, and I. B. Autenrieth.** 2004. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of HIF-1 in bacterial infections. (eingereicht zur Publikation).
92. **Kim, S. J., H. Uehara, T. Karashima, M. Mccarty, N. Shih, and I. J. Fidler.** 2001. Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice. *Neoplasia.* **3**:33-42.
93. **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**:4656-61
94. **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.
95. **Koch, A. E., P. J. Poverini, S. L. Kunkel, L. A. Harlow, L. A. DiPietro, V. M. Elnor, S. G. Elnor, and R. M. Strieter.** 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**:1798-1801.
96. **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.
97. **Koehler, J. E., F. D. Quinn, T. G. Berger, P. E. LeBoit, and J. W. Tappero.** 1992. Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N. Engl. J. Med.* **327**:1625-1631.
98. **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.

99. **Koong, A. C., E. Y. Chen, and A. J. Giaccia.** 1994. Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res.* **54**:1425-1430.
100. **Kroll, J. and J. Waltenberger.** 1997. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**:32521-32527.
101. **Ku, D. D., J. K. Zaleski, S. Liu, and T. A. Brock.** 1993. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am. J. Physiol.* **265**:H586-H592.
102. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
103. **Lando, D., D. J. Peet, J. J. Gorman, D. A. Whelan, M. L. Whitelaw, and R. K. Bruick.** 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* **16**:1466-1471.
104. **LeBoit, P. E., T. G. Berger, B. M. Egbert, J. H. Beckstead, T. S. Yen, and M. H. Stoler.** 1989. Bacillary angiomatosis. The histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease. *Am. J. Surg. Pathol.* **13**:909-920.
105. **LeCouter, J., J. Kowalski, J. Foster, P. Hass, Z. Zhang, L. Dillard-Telm, G. Frantz, L. Rangell, L. DeGuzman, G. A. Keller, F. Peale, A. Gurney, K. J. Hillan, and N. Ferrara.** 2001. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* **412**:877-884.
106. **Lee, S. H., P. L. Wolf, R. Escudero, R. Deutsch, S. W. Jamieson, and P. A. Thistlethwaite.** 2000. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N. Engl. J. Med* **342**:626-633.
107. **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.
108. **Lin, C. C., L. D. Hsiao, C. S. Chien, C. W. Lee, J. T. Hsieh, and C. M. Yang.** 2004. Tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression in human tracheal smooth muscle cells: involvement of p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB. *Cell Signal.* **16**:597-607.
109. **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.

110. **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.
111. **Mandic, A., K. Viktorsson, T. Heiden, J. Hansson, and M. C. Shoshan.** 2001. The MEK1 inhibitor PD98059 sensitizes C8161 melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Melanoma Res.* **11**:11-19.
112. **Marais, R., J. Wynne, and R. Treisman.** 1993. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**:381-393.
113. **Margileth, A. M.** 1993. Cat scratch disease. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.* **8**:1-21.
114. **Margileth, A. M., D. J. Wear, and C. K. English.** 1987. Systemic cat scratch disease: report of 23 patients with prolonged or recurrent severe bacterial infection. *J. Infect. Dis.* **155**:390-402.
115. **Martinez, P., P. Esbrit, A. Rodrigo, M. V. Alvarez-Arroyo, and M. E. Martinez.** 2002. Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *Osteoporos. Int.* **13**:874-881.
116. **Masood, R., J. Cai, T. Zheng, D. L. Smith, Y. Naidu, and P. S. Gill.** 1997. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:979-984.
117. **Matthysse, A. G.** 1987. Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **169**:313-323.
118. **Maurin, M., R. Birtles, and D. Raoult.** 1997. Current knowledge of *Bartonella* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**:487-506.
119. **Maurin, M., V. Roux, A. Stein, F. Ferrier, R. Viraben, and D. Raoult.** 1994. Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with bacillary angiomatosis. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1166-1171.
120. **Maxwell, P. H., C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe.** 2001. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**:293-299.
121. **Maynard, S. E., J. Y. Min, J. Merchan, K. H. Lim, J. Li, S. Mondal, T. A. Libermann, J. P. Morgan, F. W. Sellke, I. E. Stillman, F. H. Epstein, V. P. Sukhatme, and S. A. Karumanchi.** 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial

- dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* **111**:649-658.
122. **Meyer, M., M. Clauss, W. A. Lepple, 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.
123. **Michiels, C., E. Minet, G. Michel, D. Mottet, J. P. Piret, and M. Raes.** 2001. HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases. *IUBMB Life* **52**:49-53.
124. **Minet, E., T. Arnould, G. Michel, I. Roland, D. Mottet, M. Raes, J. Remacle, and C. Michiels.** 2000. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett.* **468**:53-58.
125. **Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa, and K. Matsushima.** 1994. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **56**:554-558.
126. **Müller, H. E.** 1992. *Rochalimaea henselae*: der Erreger von bakterieller Angiomatose, Peliosis hepatis und Septikämie. *Münch. Med. Wschr* **134**:741-743.
127. **Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak.** 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* **13**:9-22.
128. **O'Connor, S. P., M. Dorsch, A. G. Steigerwalt, D. J. Brenner, and E. Stackebrandt.** 1991. 16S rRNA sequences of *Bartonella bacilliformis* and cat scratch disease bacillus reveal phylogenetic relationships with the alpha-2 subgroup of the class Proteobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2144-2150.
129. **Oehler, M. K., S. Hague, M. C. Rees, and R. Bicknell.** 2002. Adrenomedullin promotes formation of xenografted endometrial tumors by stimulation of autocrine growth and angiogenesis. *Oncogene* **21**:2815-2821.
130. **Ogawa, K., R. Pasqualini, R. A. Lindberg, R. Kain, A. L. Freeman, and E. B. Pasquale.** 2000. The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene* **19**:6043-6052.
131. **Ogushi, K., A. Wada, T. Niidome, N. Mori, K. Oishi, T. Nagatake, A. Takahashi, H. Asakura, S. Makino, H. Hojo, Y. Nakahara, M. Ohsaki, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, H. Kurazono, J. Moss, and T. Hirayama.** 2001. *Salmonella enteritidis* FliC (flagella filament protein) induces

- human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* **276**:30521-30526.
132. **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.
133. **Perkocha, L. A., S. M. Geaghan, T. S. Yen, S. L. Nishimura, S. P. Chan, R. Garcia-Kennedy, G. Honda, A. C. Stoloff, H. Z. Klein, R. L. Goldman.** 1990. Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatis in association with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **323**:1581-1586.
134. **Pugh, C. W. and P. J. Ratcliffe.** 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* **9**:677-684.
135. **Ragno, S., M. Romano, S. Howell, D. J. Pappin, P. J. Jenner, and M. J. Colston.** 2001. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology* **104**:99-108.
136. **Regnery, R. and J. Tappero.** 1995. Unraveling mysteries associated with cat-scratch disease, bacillary angiomatosis, and related syndromes. *Emerg. Infect. Dis.* **1**:16-21.
137. **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.
138. **Regnery, R. L., J. E. Childs, and J. E. Koehler.** 1995. Infections associated with *Bartonella* species in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **21 Suppl 1**:S94-S98.
139. **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.
140. **Relman, D. A., J. S. Loutit, T. M. Schmidt, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1990. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N. Engl. J. Med.* **323**:1573-1580.
141. **Resto-Ruiz, S., 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. *Inf. Immun.* **70**:4564-70.
142. **Richard, D. E., E. Berra, E. Gothie, D. Roux, and J. Pouyssegur.** 1999. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* **274**:32631-32637.
143. **Ricketts, W.** 1949. Clinical manifestations of Carrion's disease. *Arch. Intern. Med.* **84**:751-781.
144. **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.
145. **Ridder, G. J. and A. Sander.** 1999. Clinical manifestations of cat-scratch disease in the head and neck. 1st international conference on *Bartonella* as emerging pathogens. Tuebingen/Germany, March 5-7, 1999.
146. **Riess, T., S. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, J-H. Wälzlein, U. Eehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. J. Kempf.** 2004. *Bartonella henselae* adhesin (BadA), a novel non-fimbrial adhesin mediating a proangiogenic host cell response. (eingereicht zur Publikation).
147. **Riess, T., B. Anderson, A. Fackelmayer, I. B. Autenrieth, and V. A. J. Kempf.** 2003. Rapid and efficient transposon mutagenesis of *Bartonella henselae* by transposome technology. *Gene* **313**:103-109.
148. **Risau, W.** 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**:671-674.
149. **Roberts, W. G. and G. E. Palade.** 1995. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* **108**:2369-2379.
150. **Rosenberger, C., S. Mandriota, J. S. Jurgensen, M. S. Wiesener, J. H. Horstrup, U. Frei, P. J. Ratcliffe, P. H. Maxwell, S. Bachmann, and K. U. Eckardt.** 2002. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**:1721-1732.
151. **Rousseau, S., F. Houle, J. Landry, and J. Huot.** 1997. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* **15**:2169-2177.
152. **Ruckdeschel, K., O. Mannel, K. Richter, C. A. Jacobi, K. Trulzsch, B. Rouot, and J. Heesemann.** 2001. Yersinia outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway

- and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J. Immunol.* **166**:1823-1831.
153. **Rudikoff, D., R. G. Phelps, R. E. Gordon, and E. J. Battone.** 1989. Acquired immunodeficiency syndrome-related bacillary vascular proliferation (epithelioid angiomas): rapid response to erythromycin therapy. *Arch. Dermatol.* **125**:706-707.
 154. **Saccani, S., S. Pantano, and G. Natoli.** 2002. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat. Immunol.* **3**:69-75.
 155. **Salceda, S. and J. Caro.** 1997. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* **272**:22642-22647.
 156. **Sander, A., C. Buhler, K. Pelz, E. von Cramm, and W. Bredt.** 1997. Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. *J. Clin. Microbiol.* **35**:584-587.
 157. **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.
 158. **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.
 159. **Schulte, R., R. Zumbihl, D. Kampik, A. Fauconnier, and I. B. Autenrieth.** 1998. Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* **187**:53-60.
 160. **Schwartzman, W. A.** 1992. Infections due to *Rochalimaea*: the expanding clinical spectrum. *Clin. Infect. Dis.* **15**:893-900.
 161. **Semenza, G. L.** 2000. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* **14**:1983-1991.
 162. **Semenza, G. L.** 2000. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**:71-103.
 163. **Semenza, G. L.** 2001. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* **107**:1-3.

164. **Semenza, G. L. and G. L. Wang.** 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* **12**:5447-5454.
165. **Senger, D. R., S. J. Galli, A. M. Dvorak, C. A. Perruzzi, V. S. Harvey, and H. F. Dvorak.** 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**:983-985.
166. **Seubert, A., R. Schulein, and C. Dehio.** 2002. Bacterial persistence within erythrocytes: a unique pathogenic strategy of *Bartonella* spp. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:555-560.
167. **Sheehan, M., H. R. Wong, P. W. Hake, V. Malhotra, M. O'Connor, and B. Zingarelli.** 2002. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol. Pharmacol.* **61**:953-963.
168. **Sim, E. K., L. Zhang, W. S. Shim, Y. L. Lim, and R. Ge.** 2002. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *J. Card. Surg.* **17**:350-354.
169. **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.
170. **Sosnowski, R. G., S. Feldman, and J. R. Feramisco.** 1993. Interference with endogenous ras function inhibits cellular responses to wounding. *J. Cell Biol.* **121**:113-119.
171. **Spach, D. H., A. S. Kanter, N. A. Daniels, D. J. Nowowiejski, A. M. Larson, R. A. Schmidt, B. Swaminathan, and D. J. Brenner.** 1995. *Bartonella (Rochalimaea)* species as a cause of apparent "culture-negative" endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1044-1047.
172. **Stadnyk, A. W.** 1994. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J.* **8**:1041-1047.
173. **Stein, A. and D. Raoult.** 1995. Return of trench fever. *Lancet* **345**:450-451.
174. **Strieter, R. M., S. L. Kunkel, V. M. Elner, C. L. Martonyi, A. E. Koch, P. J. Polverini, and S. G. Elner.** 1992. Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. *Am. J. Pathol.* **141**:1279-1284.
175. **Stroka, D. M., T. Burkhardt, I. Desbaillets, R. H. Wenger, D. A. Neil, C. Bauer, M. Gassmann, and D. Candinas.** 2001. HIF-1 is expressed in

- normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* **15**:2445-2453.
176. **Tian, H., S. L. McKnight, and D. W. Russell.** 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* **11**:72-82.
177. **Tokunaga, N., N. Nagaya, M. Shirai, E. Tanaka, H. Ishibashi-Ueda, M. Harada-Shiba, M. Kanda, T. Ito, W. Shimizu, Y. Tabata, M. Uematsu, K. Nishigami, S. Sano, K. Kangawa, and H. Mori.** 2004. Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation* **109**:526-531.
178. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**:4350-4354.
179. **van Der, F., F. Coenjaerts, J. L. Kimpen, A. M. Hoepelman, and S. P. Geelen.** *Streptococcus pneumoniae* induces secretion of vascular endothelial growth factor by human neutrophils. *Infect. Immun.* 2000. **68**:4792-4794.
180. **Verma A, G. E. Davis, and G. M. Ihler.** 2001. Formation of stress fibres in human endothelial cells infected with *Bartonella bacilliformis* is associated with altered morphology, impaired migration and defects in cell morphogenesis. *Cell. Microbiol.* **3**:169-180.
181. **Volkman, B.** 2004. Induktion von vaskulo-endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) durch *Bartonella henselae*. Dissertation.
182. **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.
183. **Wang, Q., X. Wang, and B. M. Evers.** 2003. Induction of cIAP-2 in human colon cancer cells through PKC delta/NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* **278**:51091-51099.
184. **Waskiewicz, A. J. and J. A. Cooper.** 1995. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:798-805.
185. **Wälzlein, JH.** 2004. Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Hypoxia-Inducible Factor-1* (HIF-1) durch *Bartonella henselae*. Diplomarbeit.

186. **Webster, G. F., C. J. Cockerell, and K. A. Friedman.** 1992. The clinical spectrum of bacillary angiomatosis. *Br. J. Dermatol.* **126**:535-541.
187. **Weindel, K., D. Marme, and H. A. Weich.** 1992. AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells in culture express vascular endothelial growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**:1167-1174.
188. **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.
189. **Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis .** 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* **74**:589-607.
190. **Wiesener, M. S., J. S. Jurgensen, C. Rosenberger, C. K. Scholze, J. H. Horstrup, C. Warnecke, S. Mandriota, I. Bechmann, U. A. Frei, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, S. Bachmann, P. H. Maxwell, and K. U. Eckardt.** 2003. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* **17**:271-273.
191. **Wiesener, M. S., P. M. Munchenhagen, I. Berger, N. V. Morgan, J. Roigas, A. Schwiertz, J. S. Jurgensen, G. Gruber, P. H. Maxwell, S. A. Loning, U. Frei, E. R. Maher, H. J. Grone, and K. U. Eckardt.** 2001. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res.* **61**:5215-5222.
192. **Wiesener, M. S., H. Turley, W. E. Allen, C. Willam, K. U. Eckardt, K. L. Talks, S. M. Wood, K. C. Gatter, A. L. Harris, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, and P. H. Maxwell.** 1998. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* **92**:2260-2268.
193. **Winans, S. C.** 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* **56**:12-31.
194. **Winzen, R., M. Kracht, B. Ritter, A. Wilhelm, C. Y. Chen, A. B. Shyu, M. Muller, M. Gaestel, K. Resch, and H. Holtmann.** 1999. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.* **18**:4969-4980.
195. **Wong, A. K., M. Alfert, D. H. Castrillon, Q. Shen, J. Holash, G. D. Yancopoulos, and L. Chin.** 2001. Excessive tumor-elaborated VEGF and its neutralization define a lethal paraneoplastic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:7481-7486.

196. **Wotherspoon, A. C., C. Doglioni, T. C. Diss, L. Pan, A. Moschini, M. de Boni, and P. G. Isaacson.** 1993. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* **342**:575-577.
197. **Xia, M., R. E. Bumgarner, M. F. Lampe, and W. E. Stamm.** 2003. *Chlamydia trachomatis* infection alters host cell transcription in diverse cellular pathways. *J. Infect. Dis.* **187**:424-434.
198. **Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, and M. E. Greenberg.** 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**:1326-1331.
199. **Yamasaki, R., K. Yokota, H. Okada, S. Hayashi, M. Mizuno, T. Yoshino, Y. Hirai, D. Saitou, T. Akagi, and K. Oguma.** 2004. Immune response in *Helicobacter pylori*-induced low-grade gastric-mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *J. Med. Microbiol.* **53**:21-29.
200. **Yoshida, S., M. Ono, T. Shono, H. Izumi, T. Ishibashi, H. Suzuki, and M. Kuwano.** 1997. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol. Cell Biol.* **17**:4015-4023.
201. **Yu, F., S. B. White, Q. Zhao, and F. S. Lee.** 2001. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98** :9630-9635.
202. **Zangwill, K. M., D. H. Hamilton, B. A. Perkins, R. L. Regnery, B. D. Plikaytis, J. L. Hadler, M. L. Cartter, and J. D. Wenger.** 1993. Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. *N. Engl. J. Med.* **329**:8-13.
203. **Zink, S. D., L. Pedersen, N. P. Cianciotto, and Y. Abu-Kwaik.** 2002. The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect. Immun.* **70**:1657-1663.
204. **Zöfel, P.** 1985. *Statistik in der Praxis*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

7 Abkürzungen

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

A.	<i>Agrobacterium</i>
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ad	lat.: bis
ADM	Adrenomedullin
aFGF	<i>acidic fibroblast growth factor</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
B.	<i>Bartonella</i>
BA	Bazilläre Angiomatose
BA	Bisacrylamid
BadA	<i>Bartonella</i> Adhäsion A
bp	Basenpaare
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
clAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CSD	<i>cat scratch disease</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole-2HCl
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
E.	<i>Escherichia</i>
ECL	<i>enhanced chemo luminescence</i>

EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (lat.: und so weiter)
evtl.	eventuell
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FIH	<i>factor inhibiting HIF</i>
Fn	Fibronektin
g	Erdbeschleunigung
Gln	Glutamin
h	Stunde
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
HHV	Humanes Herpes Virus
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O dest.	einfach destilliertes Wasser
H ₂ O bidest.	zweifach destilliertes Wasser
HRE	<i>hypoxia response element</i>
HUVEC	<i>human umbilical vene endothelial cell</i>
Ig	Immunglobulin
IGFBP-3	<i>insulin-like growth factor binding protein-3</i>
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
inv.	Invasin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter

L.	<i>Legionella</i>
LB	Luria Bertani
M	mol/l
MALT	<i>mucosa associated lymphatic tissue</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MEK	MAP/ERK Kinase
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
OD	optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PH	Peliosis hepatis
PMA	Phorbol-12 Myristate-13-Acetat
PMSF	Phenylmethansulfon-Säurefluorid
PNPP	P-Nitrophenyl-Phosphat
PVDF	Polyvenylidenfluorid
rh	<i>recombinant human</i>
RIA	<i>radio immuno assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe

SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sec	Sekunden
SI	Stimulationsindex
sog.	sogenannt
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
VHL	von Hippel-Lindau
v/v	Volumen pro Volumen
Y.	<i>Yersinia</i>
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsion A
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8 Anhang

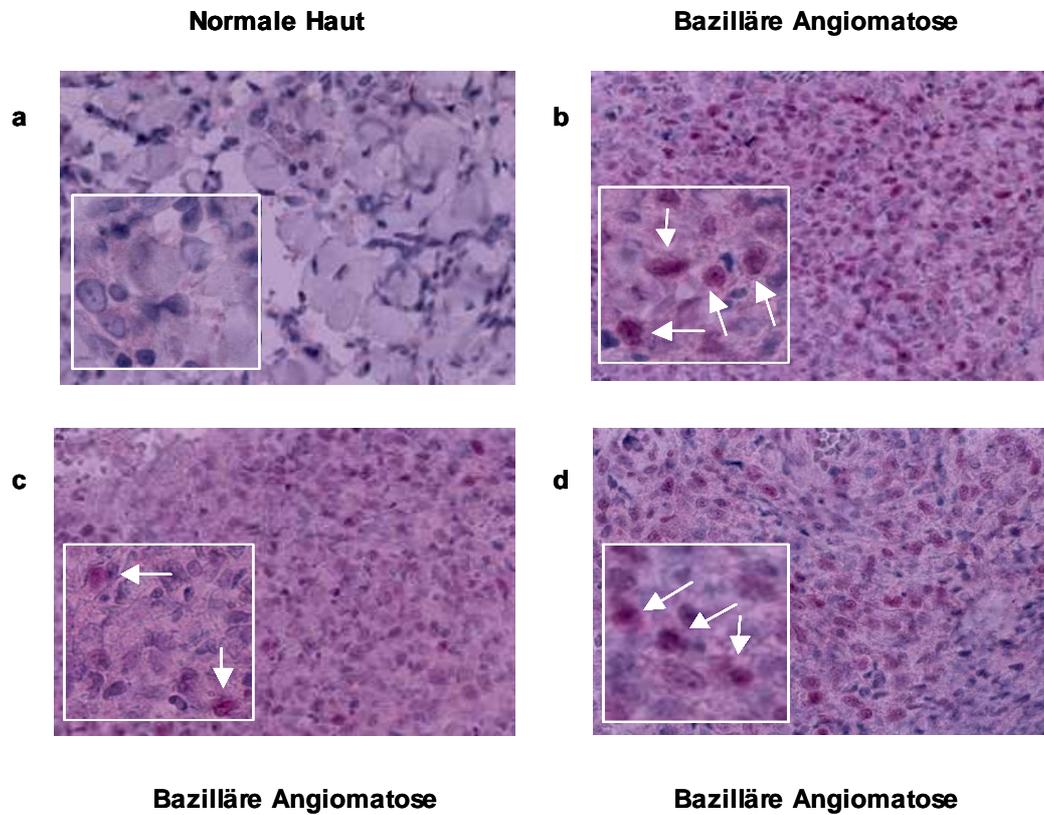


Abb. 1: Aktivierung von HIF-1 α in Biopsaten von Patienten mit Bazillärer Angiomatose⁹¹. Immunohistochemischer Nachweis von HIF-1 α in normaler Haut (a) und drei Biopsaten von BA-Patienten (b-d) unter Verwendung eines HIF-1 α spezifischen Antikörpers (rot). HIF-1 α liegt nukleär lokalisiert vor (siehe Pfeile).

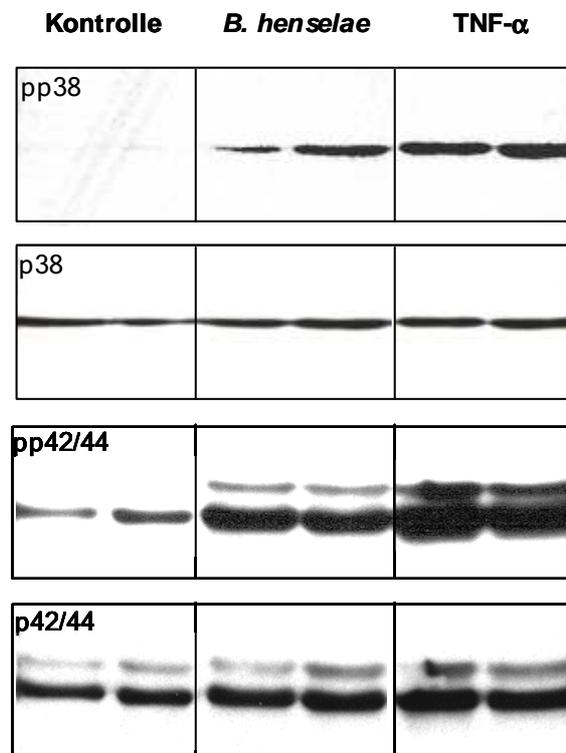


Abb. 2: Phosphorylierung von p38 und p42/p44 in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*. Detektierung von konstitutiv exprimiertem p38 und p42/p44 sowie der phosphorylierten (= aktivierten) Form pp38 und pp42/p44 mittels Western blot. Als Positivkontrolle diente TNF- α (50 ng/ml) (Kempf, V. A. J., *et al.*, nicht publiziert).

Tab. 1

Induzierte Gene nach Infektion mit <i>B. henselae</i>	Abkürzung	Induktion Array ^a	Induktion Light Cycler ^b RT-PCR ^c	Transkriptionsfaktor	Biologische Funktion
Vaskuloproliferation					
1. Interleukin-8	IL-8	6,41	5,80	NF-κB, AP-1	angioproliferativ, proinflammatorisch
2. Stanniocalcin-2	STC2	5,18	ja	HIF-1	Signaltransduktion
3. Adrenomedullin	ADM	3,88	ja	HIF-1	angioproliferativ
4. Ephrin A1	EFNA1	3,74	n.d.	HIF-1	Modulation der Angioproliferation
5. <i>vascular endothelial growth factor</i>	VEGF	3,54	5,10	HIF-1	angioproliferativ
6. <i>insulin-like growth factor binding protein-3</i>	IGFBP-3	2,67	ja	HIF-1	angioproliferativ
7. Endothelin 2	ET-2	2,13	n.d.	HIF-1	Modulation der Angioproliferation
Glykolyse					
8. Hexokinase 2	HK2	4,37	ja	HIF-1	Schlüsselreaktion der Glykolyse
9. Glukose Transport Protein 3	SLC2A3	2,87	n.d.	HIF-1	Glukosetransport in die Zelle
10. Enolase 2	ENO2	2,82	n.d.	HIF-1	Glykolyse
Signaltransduktion					
11. N-myc <i>downstream regulated gene 1</i>	NDRG1	4,85	ja	HIF-1	Signaltransduktion
12. Muskuloaponeurotisches Fibrosarkoma Onkogen Homolog f	v-maf	4,45	n.d.	?	Transkription des Pol2 Promotors
13. <i>nuclear factor IL-3 regulated</i>	NFIL3	2,9	n.d.	HIF-1	Transkription des Pol2 Promotors
14. Zyklin G2	CCNG2	2,77	ja	HIF-1 ^d	Kontrolle des Zellzyklus
15. <i>hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 2</i>	HCN2	2,68	n.d.	?	Signaltransduktion
16. max-interagierendes Protein 1	MXI1	2,51	n.d.	?	Kontrolle des Zellzyklus
17. p21-aktivierte Kinase 2	PAK2	2,26	ja	HIF-1 ^d	Signaltransduktion
unbekannt					
18. KIAA0742 Protein	KIAA0742	3,70	n.d.	?	unbekannt
19. Homo sapiens cDNA	FLJ22182fis	2,85	n.d.	?	unbekannt
20. Hypothetisches Protein	FLJ20500	2,59	n.d.	HIF-1	unbekannt

^a Die Analyse von zwei voneinander unabhängigen Datensets wurde auf dem Affymetrix Microarray suite 5.0 and Affymetrix data mining tool 3.0 durchgeführt

^b x-fache Induktion verglichen mit der Negativkontrolle (β1-Mikroglobulin normalisiert)

^c detektiert mittels konventioneller RT-PCRs

^d indirekter Hinweis (Induktion durch Hypoxie)

Entnommen aus: Kempf *et al.*, Activation of hypoxia inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of HIF-1 in bacterial infections (zur Veröffentlichung eingereicht)

9 Publikationen

Kempf, V. A. J., M. Lebidziejewski, K. Alitalo, J-H. Wälzlein, U. Eehalt, J. Fiebig, B. Schütt, C. Sander, S. Müller, G. Grassl, B. Brem, I. B. Autenrieth. 2004. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of HIF-1 in bacterial infections. (zur Veröffentlichung eingereicht).

Riess, T., S. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, J-H. Wälzlein, U. Eehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, V. A. J. Kempf. 2004 *Bartonella henselae* adhesin A (BadA), a novel non-fimbrial adhesin mediating a proangiogenic host cell response. (zur Veröffentlichung eingereicht).

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Volkhard Kempf für seine ausgezeichnete Betreuung, für sein unermüdliches Engagement und für seine Geduld bei der Durchsicht der Manuskripte.

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

Ferner möchte ich Herrn Dr. Burkhardt Schütt für seine Hilfe bei der Auswertung der RIA-Daten danken.

Für ihre freundliche Zusammenarbeit möchte ich ganz besonders der Arbeitsgruppe danken. Ihre Hilfsbereitschaft schuf ein angenehmes Arbeitsklima und ermöglichte produktives Arbeiten.

Christian Eberhardt und Matteo Quitadamo danke ich für das kritische Korrekturlesen und ihre Hilfeleistung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich Joo-Hee Wälzlein für ihre Unterstützung danken. Ihre Hilfe ermöglichte es mir die Arbeit in dieser Form fertig zustellen.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Urs Thorsten Eehalt
geboren: 17. April 1978 in Sinsheim

Schulbildung

09/84 - 07/88 Grundschole in Marbach a. N.
09/88 - 07/97 Friedrich-Schiller-Gymnasium in Marbach a. N.,
Abitur

Zivildienst

07/97 - 08/98 Rotes Kreuz in Stuttgart
Ausbildung zum Rettungshelfer und
Rettungssanitäter

Studium

10/98 - bis jetzt Studium der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
08/2000 Physikum
08/2001 1. Staatsexamen
03/2004 2. Staatsexamen
04/2005 3. Staatsexamen

Promotionsarbeit

04/2002 – 04/2004 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
Prof. Dr. I. B. Autenrieth

