

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Untersuchungen zur Regulation der Expression des
Bartonella-Adhäsins A (BadA) Gens von *Bartonella henselae***

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

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

vorgelegt von

Katja Vanessa Schmidt

aus

Pforzheim

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. V. Kempf

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Wesselborg

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Gattung <i>Bartonella</i>	1
1.1.1	Taxonomie, Geschichte und mikrobiologische Charakteristika	1
1.1.2	Durch <i>Bartonella</i> spp. verursachte Erkrankungen.....	1
1.1.2.1	<i>B. bacilliformis</i> -Infektionen.....	2
1.1.2.2	<i>B. quintana</i> -Infektionen.....	3
1.1.2.3	<i>B. henselae</i> -Infektionen.....	3
1.1.2.3.1	Pathogenese der durch <i>B. henselae</i> verursachten Infektionen.....	4
1.1.2.3.2	Katzenkratzkrankheit	5
1.1.2.3.3	Vaskuloproliferative Krankheitsbilder	7
1.1.3	Epidemiologie	9
1.1.4	Diagnostik und Therapie	10
1.1.5	<i>Bartonella</i> Adhäsın A (BadA)	11
1.2	Angiogenese.....	12
1.2.1	Bakteriell induzierte Angiogenese.....	14
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Geräte.....	17
2.1.2	Plastik- und Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3	Chemikalien	19
2.1.4	Enzyme	20
2.1.5	Kits.....	20
2.1.6	Oligonukleotide für PCR-Untersuchungen	21
2.1.7	Antikörper	22
2.1.8	Größenstandards	22
2.1.9	Antibiotika	22
2.1.10	Bakterienstämme	22
2.1.11	Verwendete Zellen	23
2.1.12	Medien	23
2.1.13	Puffer und Stammlösungen	24
2.2	Methoden.....	28

2.2.1	Bakterien.....	28
2.2.1.1	Bakterienanzucht und Kultivierung für <i>in-vitro</i> -Experimente	28
2.2.1.2	Herstellung von Bakterienstocks	28
2.2.1.3	Testung neuer Bakterienmedien	28
2.2.2	Zellkultur	29
2.2.2.1	Kultivierung von Endothelzellen	29
2.2.2.2	Kultivierung von Insektenzellen	30
2.2.2.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	30
2.2.2.4	Infektionsexperimente	30
2.2.3	Methoden zum Proteinnachweis	31
2.2.3.1	Proteingewinnung für Western Blot.....	31
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.2.3.3	Western Blot	33
2.2.3.4	Immunfluoreszenz-Mikroskopie / konfokale Laserscanningmikroskopie .	34
2.2.3.5	Elektronenmikroskopie	34
2.2.4	RT-PCR	35
2.2.4.1	RNA-Isolierung	35
2.2.4.2	DNA-Verdau und PCR.....	36
2.2.4.3	Grundlagen der Methode.....	36
2.2.4.4	MicrobEnrich-Kit	41
2.2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.2.4.6	Northern-Gelelektrophorese	44
2.2.5	Statistik	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Expression von <i>Bartonella</i> Adhäsın A (<i>BadA</i>).....	46
3.1.1	Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die <i>badA</i> - Transkription	46
3.1.2	Einfluss unterschiedlicher DFO-Konzentrationen auf die <i>badA</i> - Transkription	55
3.1.3	Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die <i>badA</i> -Transkription.....	58
3.2	Einfluss zellulärer Interaktion auf die <i>badA</i> -Transkription	63
3.2.1	Interaktion von <i>B. henselae</i> mit Schneiderzellen	63
3.2.2	Interaktion von <i>B. henselae</i> mit Endothelzellen	64
3.3	Testung von Flüssigmedien	64

4	Diskussion	68
4.1	BadA-Expression im Katzenfloh oder im Menschen?	69
4.1.1	Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die <i>badA</i> -Expression	70
4.1.2	Einfluss von Eisenmangel auf die <i>badA</i> -Expression	75
4.1.3	Einfluss der O ₂ -Konzentration auf die <i>badA</i> -Expression	76
4.2	Einfluss von Wirtszellen auf die Transkription von <i>badA</i>	78
4.3	Etablierung eines Insektenzellmediums als Wachstumsmedium für <i>B. henselae</i>	80
4.4	Ausblick	81
5	Zusammenfassung	82
6	Tabellen	84
7	Abkürzungen	85
8	Literaturverzeichnis	89
9	Publikation	103
10	Danksagung	
11	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Bartonella*

1.1.1 Taxonomie, Geschichte und mikrobiologische Charakteristika

Bei Bakterien der Gattung *Bartonella* handelt es sich um gramnegative, fakultativ intrazelluläre, mikroaerophile Stäbchenbakterien von ca. 2 µm Länge und 0,5 µm Breite (107). Die *in-vitro*-Kultivierung erfolgt auf Schokoladen-, Kochblut- oder Hämin-angereichertem Agar bei 35-37 °C, erhöhter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ oder in Zellkulturen (43).

Bartonella spp. gehören zur Klasse der α₂-Proteobakterien und sind phylogenetisch eng mit den Gattungen *Brucella*, *Agrobacterium* und *Rhizobium* verwandt (93). Das zuerst entdeckte Bakterium der Gattung *Bartonella* war *B. bacilliformis* und blieb bis Anfang der 90er Jahre der einzige bekannte Vertreter der Gattung. 1993 konnte große genetische und molekularbiologische Übereinstimmung mittels 16S-RNA und DNA-Analysen zwischen den Bakterien der Gattung *Rochalimaea* und *B. bacilliformis* gezeigt werden, so dass in Folge alle Spezies der Gattung *Rochalimaea* der Gattung *Bartonella* zugeordnet wurden (15,100). Bis heute wurden 20 Spezies beschrieben, davon gelten neun als humanpathogen: *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. henselae*, *B. quintana*, *B. rochalimaea*, *B. vinsonii* und *B. washoensis* (38). *B. henselae*, *B. quintana* und *B. bacilliformis* können beim Menschen angioproliferative Krankheitsbilder auslösen, eine Fähigkeit, die von anderen Bakteriengattungen bisher nicht bekannt war.

1.1.2 Durch *Bartonella* spp. verursachte Erkrankungen

Bartonella spp. sind Säugetier-Pathogene mit engem Wirtsspektrum, d.h. sie sind jeweils nur an einen oder wenige Säugetierwirte, sog. Reservoirwirte, angepasst. V.a. blutsaugende Arthropoden wie zum Beispiel Läuse und Flöhe spielen eine Rolle in der Übertragung der Erreger. Neuere Untersuchungen lassen darauf schließen, dass Zecken ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Übertragung von *Bartonella* spp. zukommt (46). Die Infektion eines Reservoirwirts führt in der Regel zu einer intraerythrozytären Bakteriämie. Wird

ein Fehlwirt infiziert, kann sich dies hingegen in unterschiedlichen Krankheitsbildern manifestieren (64).

Für *B. bacilliformis* und *B. quintana* stellt der Mensch den Reservoirwirt dar, für *B. henselae* die Katze. *B. bacilliformis* ist Verursacher der Carrion'schen Krankheit (7), die lebensbedrohliche Verläufe (hämolytische Anämie) zeigt und durch Sandfliegen übertragen wird. Als Vektoren für *B. quintana* dienen Körperläuse. *B. quintana* verursacht Fünftagefieber, Endokarditis und Bazilläre Angiomatose (BA) (9). Typisch ist jeweils auch beim Fehlwirt eine intraerythrozytäre Bakteriämie (36).

In der Katze verursacht *B. henselae* eine Bakteriämie ohne typische Krankheitszeichen (73). Der Mensch stellt für *B. henselae* einen Fehlwirt dar. Für den Verlauf einer Infektion ist der Immunstatus des Erkrankten entscheidend. Eine Infektion mit *B. henselae* äußert sich beim Immunkompetenten zumeist als selbstlimitierende Katzenkratzkrankheit (KKK) (35). Bei Menschen mit herabgesetzter zellulärer Immunität, beispielsweise Menschen mit HI-Virus-Infektion im AIDS-Stadium, kann eine *B. henselae*-Infektion vaskuloproliferative Krankheitsbilder auslösen (16,37,74,106,136).

1.1.2.1 *B. bacilliformis*-Infektionen

B. bacilliformis ist der Erreger der Carrion'schen Krankheit, die in den Anden Südamerikas endemisch auftritt und durch die Sandfliegen der Gattungen *Lutzomyia* und *Phlebotomus* auf den Menschen übertragen wird (4). Die Erkrankung zeigt einen biphasischen Verlauf. Nach einer Inkubation von 2-6 Wochen kommt es zu einer hämolytischen Anämie durch massive Invasion der Erreger in Erythrozyten, Septikämien und intermittierendes hohes Fieber. Diese Symptome sind verbunden mit einer hohen Letalität (3,12). Da Mitte des 19. Jahrhunderts diese erste Phase der Carrion'schen Krankheit beim Bau der Eisenbahnlinie zwischen Lima und La Oroya rund 10.000 Arbeitern das Leben kostete, wird sie heute „Oroya-Fieber“ genannt. Überlebt der Infizierte das Oroya-Fieber, können nach Wochen bis Monaten noduloverruköse, teleangiektatische Granulome im Bereich von Gesicht und Extremitäten

auftreten. Diese Hauteffloreszenzen jucken und können gelegentlich bluten und von osteoartikulären Schmerzen begleitet sein. Diese Krankheitsmanifestation ist die chronische Phase der Carrion'schen Krankheit und wird als *Verruga peruana* bezeichnet (88,111,112,122). 1885 konnte Daniel Carrion in einem letalen Selbstversuch den Zusammenhang zwischen der chronisch-lokalisierter Form der *Verruga peruana* sowie der septischen Variante, dem Oroya-Fieber, nachweisen (61).

1.1.2.2 *B. quintana*-Infektionen

Das Fünftagefieber ist die klinische Manifestation einer Infektion mit *B. quintana* und wird durch die Kleiderlaus *Pediculus humanus corporis* von Mensch zu Mensch übertragen (8). Heutzutage sind *B. quintana*-Infektionen v.a. bei Personen zu finden, die unter schlechten hygienischen Bedingungen leben, z.B. Obdachlose, Drogenabhängige und Alkoholiker (17,63,135). Die Spannweite der klinischen Manifestation einer *B. quintana*-Infektion ist groß und reicht von asymptomatischen Infektionen bis hin zu schweren Erkrankungen. Klassisch sind periodische Fieberschübe, begleitet von starken Kopfschmerzen, Schwindel, Knochenschmerzen der Tibia sowie einer anhaltenden Bakteriämie. Endokarditis sowie vaskuloproliferative Krankheitsbilder wie die BA können ebenfalls Folgen einer Infektion mit *B. quintana* sein.

Da die Krankheit vor allem epidemisch während der beiden Weltkriege vorkam wird sie auch als „Schützengrabenfieber“ bezeichnet (94). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde der Erreger *Rickettsia quintana* benannt, 1961 in *Rochalimaea quintana* umbenannt und schließlich 1993 der Gattung *Bartonella* zugeordnet (78). Mit dem Rückgang der Epidemien nach den Weltkriegen verlor sich auch das Interesse an diesem Erreger, bis 1992 *B. quintana* als eine Ursache der Bazillären Angiomatose identifiziert wurde (75).

1.1.2.3 *B. henselae*-Infektionen

1990 konnte *B. henselae* erstmals aus dem Blut eines mit dem HI-Virus infizierten Patienten isoliert und in Folge als Ursache für Fieber und Bakteriämien definiert werden (133). 1992 erfolgte die Charakterisierung des Bakteriums und die Benennung nach der medizinisch-technischen Assistentin

Diane Hensel (106). Inzwischen konnte *B. henselae* mit verschiedensten Krankheitsbildern in Verbindung gebracht werden. Die möglichen klinischen Manifestationen einer *B. henselae*-Infektion sind bzgl. ihrer Morphologie und dem Befall von Organsystemen sehr breit gefächert (s. Tab. 1).

Tab. 1: Klinische Manifestationen einer *B. henselae*-Infektion

Krankheitsbild	Charakteristik	Erreger-Nachweis	Referenz
Katzenkratzkrankheit	Lymphadenopathie/ Lymphadenitis i.d.R. selbstlimitierend, 10 % Komplikationen abhängig vom Immunstatus	Serologie PCR	(43,108)
Vaskuloproliferationen (PH und BA)	i.d.R. Immunsupprimierte, selten Immunkompetente	Histologie PCR Kultur	(81,82,134)
Sonstige <ul style="list-style-type: none"> • Enzephalitis • Endokarditis • Osteomyelitis • Innere Organe 	Verlauf abhängig vom Immunstatus	Serologie PCR Kultur	(54,82,105,129, 134,139,148)

1.1.2.3.1 Pathogenese der durch *B. henselae* verursachten Infektionen

In-vitro-Untersuchungen konnten Aufschluss über die humorale Immunität gegen *B. henselae* geben (121). Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien binden C3, und somit wird der alternative Weg der Komplementkaskade aktiviert. Darüber hinaus vermag *B. henselae* ohne Anwesenheit spezifischer Antikörper den klassischen Weg der Komplementkaskade anzuschalten. Auf die finale, Komplement-vermittelte Zytolyse reagieren *Bartonella* spp. sehr sensibel.

V.a. bei Immunsupprimierten konnten Bakteriämien mit *B. henselae* beschrieben werden, allerdings auch bei Immunkompetenten (19,85,107,133). Aus diesen Beobachtungen wurde die Hypothese postuliert, dass die Erreger sich in einer intrazellulären Nische aufhalten, um immunologische Abwehrmechanismen des Wirts zu umgehen. Weitere Tatsachen stützen diese

Hypothese: Antibiotika, die gut in Zellen penetrieren (z.B. Makrolide) sind von besonderer Wirksamkeit, das häufige Auftreten von Rezidivkrankungen spricht für ein intrazelluläres Überleben der Bakterien und schließlich ist es möglich, durch Lyse-Zentrifugation von Blutkulturen höhere Keimzahlen beim Ausplattieren zu erreichen (16).

Infektionsbiologische Grundlagen in der Pathogenese von *Bartonella*-Infektionen sind Adhäsion und Invasion des Bakteriums an/in die Wirtszelle. Dabei spielen Oberflächenmembranproteine (*outer membrane proteins, OMPs*), das Trimere Autotransporter-Adhäsin *Bartonella* Adhäsin A (BadA) oder auch das Typ IV-Sekretionssystem von *B. henselae* eine wichtige Rolle.

1.1.2.3.2 Katzenkratzkrankheit

1950 wurde die Katzenkratzkrankheit erstmals ausführlich beschrieben, allerdings konnte man sie keinem Erreger zuordnen (35). Die Diagnose ließ sich lange Zeit nur klinisch anhand von folgenden vier Merkmalen stellen:

- (i) Kratzverletzung durch eine Katze,
- (ii) positive Reaktion beim Hauttest nach Hangar und Rose (aus befallenen Lymphknoten wurde Antigen gewonnen und intradermal injiziert),
- (iii) charakteristische Lymphknotenhistologie und
- (iv) keine anderen Laborbefunde, die eine Lymphadenopathie erklärten.

Trafen drei dieser Merkmale zu, galt die Diagnose als gesichert. 1988 wurden Erreger aus einem Lymphknoten eines an Katzenkratzkrankheit leidenden Patienten isoliert und drei Jahre später als *Afipia felis* charakterisiert (14,45). 1992 zeigten Untersuchungen jedoch, dass Patienten mit Katzenkratzkrankheit in 88 % der Fälle Antikörper gegen *B. henselae*, nicht aber gegen *Afipia felis* aufwiesen, so dass *Afipia felis* als Erreger der Katzenkratzkrankheit an Bedeutung verlor (108). Schließlich war es ab 1993 möglich, *B. henselae* aus befallenen Lymphknoten zu isolieren, zu kultivieren und mittels PCR zu identifizieren (40).

Der natürliche Wirt von *B. henselae* ist die Katze (123). Kommt es zu einer Besiedlung des Fehlwirtes Mensch, sind Infektionen mit unterschiedlichen Krankheitsbildern die Folge. Bei immunkompetenten Personen, die über eine

intakte zelluläre Abwehr verfügen, kann sich eine *B. henselae*-Infektion typischerweise als Katzenkratzkrankheit manifestieren. Die Übertragung des Erregers von Katzen auf den Menschen ist direkt durch Kratz- und Bissverletzungen oder indirekt über Katzenflöhe (26,27) möglich. In 50-75 % der Fälle bildet sich an der Stelle des Flohbisses bzw. Katzenkratzers nach 4-6 Tagen eine Papel oder Pustel aus (s. Abb. 1) (1).

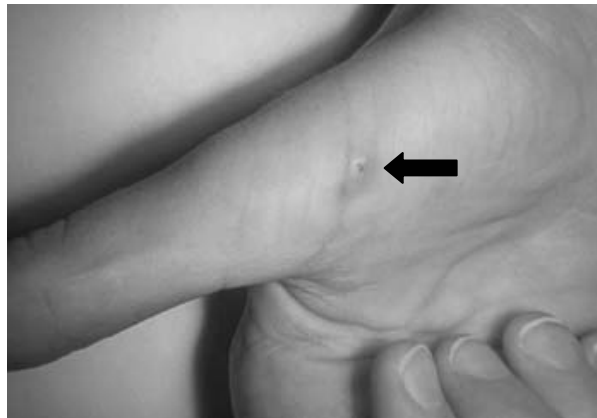


Abb. 1: Inokulationsstelle der *B. henselae*-Infektion. Ausgebildete Pustel nach Katzenkratzer oder Flohbiss im Rahmen einer Katzenkratzkrankheit. (<http://www.animal-health-online.de/drms/klein/katzenkratz.jpg>).

Nach 7-50 Tagen folgt eine Lymphadenopathie oder Lymphadenitis der regionalen Lymphknoten (9). 80 % aller befallenen Lymphknoten sind kranial, nuchal oder an der oberen Extremität gelegen (s. Abb. 2) (144,148,150). Untersucht man befallene Lymphknoten histologisch, sind nekrotisierende, granulomatöse Entzündungsreaktionen mit lymphatischem Infiltrat und mehrkernigen Riesenzellen zu beobachten. Bei 15 % der Patienten kommt es zu einer Abszessbildung der befallenen Lymphknoten (6,95,144). Bei 50 % der Patienten bleibt die Lymphadenitis die einzige Manifestation. Die restlichen 50 % der Patienten leiden zusätzlich unter Begleitsymptomen wie Fieber, Kopfschmerzen, Gelenk- und Muskelschmerzen, Übelkeit, Gewichtsverlust und Splenomegalie.



Abb. 2: Klinische Manifestation der KKK. Zervikale Lymphadenopathie.

(http://www.healthofchildren.com/images/gech_0001_0003_0_img0171.jpg).

Schwerwiegende Komplikationen beobachtet man nur in 10 % der Fälle, dabei handelt es sich in erster Linie um das Parinaud'sche okuloglanduläre Syndrom, Enzephalitis, zerebrale Arteriitis, Radikulitis, Myelitis, granulomatöse Hepatitis oder Splenitis. Auch atypische Pneumonien, hiläre Lymphadenopathie, Pleuraerguss, Osteomyelitis, Erythema nodosum oder auch das Erythema anulare stehen mit der KKK in Verbindung (13,20,54,89,90,129,147,148). Diese Komplikationen stellen jeweils die Indikation für eine fünftägige antibiotische Therapie mit Azithromycin, während bei einer blande verlaufenden KKK nach ein bis zwei Monaten eine spontane Rückbildung zu beobachten ist und diese i.d.R. nur eine symptomatische Therapie erfordert.

1.1.2.3.3 Vaskuloproliferative Krankheitsbilder

Beim Immunsupprimierten kommt es auf Grund der eingeschränkten zellulären Abwehr zu schwerwiegenderen Manifestationen der *B. henselae*-Infektion, die als Bazilläre Angiomatose (BA) oder Peliosis hepatis (PH) bezeichnet werden (16,74,106,136). Der schwere Verlauf ist auf die mögliche intrazelluläre Persistenz des Erregers zurückzuführen (16).

Eine unter sämtlichen Bakterienspezies einzigartige Eigenschaft von *B. henselae* ist die Fähigkeit, vaskuloproliferative Erkrankungen beim Fehlwirt Mensch hervorzurufen. Man spricht dabei von BA, sofern sich die Manifestation an der Haut oder den inneren Organen abspielt, von PH beim Befall der Leber. In der CDC-Klassifikation des *U.S. Centers for Disease Control and Prevention*

gilt die BA als AIDS-definierende Erkrankung. BA wurde erstmals 1983 bei AIDS-Patienten beschrieben (31,137), kann aber durchaus auch bei Immunkompetenten beobachtet werden (29,30,109,139,140). Ausgelöst wird sie durch *B. henselae* oder *B. quintana*, während die PH ausschließlich durch *B. henselae* verursacht wird (38). Die BA wird weiter in eine kutane Form mit einzeln oder mehrfach auftretenden Hautläsionen und eine parenchymatöse Form, bei der ausschließlich innere Organe wie Milz, Lymphknoten oder Knochenmark befallen sind, unterteilt (38). Morphologisch ähneln die kutanen, z.T. auch subkutanen Läsionen mit ihrem rötlich-lividen Aussehen dem durch das Humane Herpesvirus-8 hervorgerufenen Kaposi-Sarkom (s. Abb. 3).



Abb. 3: Kutane Form der BA.

(http://research.bidmc.harvard.edu/VPTutorials/HIV/tuPhot/images/39_640.jpg).

Bei der PH handelt es sich um eine seltene vaskuloproliferative Hepatopathie (s. Abb. 4), die meist HIV-Patienten betrifft. Mikroskopisch fallen dilatierte Lebersinusoiden mit zystischen, blutgefüllten Endothelzell-Proliferationen auf, das Stroma ist myxoid verändert (74,129). Die Patienten leiden unter Abdominalschmerzen, Hepatomegalie, Gewichtsverlust und Fieber (98). Neben *B. henselae* als Ursache ist diese Erkrankung auch als Folge eines fortgeschrittenen Tumorleidens oder nach Anabolikosteroid-Therapie zu beobachten (103,145).



Abb. 4: Radiologische Darstellung einer PH. (<http://kjronline.org/figure/sv8n1064Fig4>).

Beide Formen der BA sowie die PH indizieren immer eine mindestens drei Wochen dauernde antibiotische Intervention. Zu Verfügung stehen Makrolide, Tetracycline oder Rifampicin, unter der zumeist eine komplette Rückbildung der vaskuloproliferativen Erscheinungen beobachtet werden kann (2,6).

1.1.3 Epidemiologie

Die Prävalenz der KKK durch *B. henselae* wurde 1993 in den USA mit 9,3 Fällen pro 100.000 Einwohnern beziffert (62). Dabei konnte bei 4-6 % der gesunden Bevölkerung spezifische *Bartonella* Antikörper nachgewiesen werden (150). Bei 80 % der Patienten mit KKK handelt es sich um Kinder und Adoleszente, davon gaben rund 90 % anamnestisch einen Kontakt zu Katzen an. Dagegen war bei Patienten mit Bazillärer Angiomatose nur in 20 % der Fälle ein Kontakt zu Katzen eruiert (150). In Deutschland hatten nachweislich 81 % der Patienten mit Katzenkratzkrankheit eine mit *B. henselae* infizierte Katze zuhause, dagegen waren bei gesunden Katzenbesitzern nur 38 % der Hauskatzen positiv getestet worden (126).

Studien zur Seroprävalenz von Katzen fielen geografisch betrachtet sehr unterschiedlich aus: so sind in der Gegend um San Francisco (USA) 41 % der Hauskatzen positiv auf *Bartonella*-Antikörper getestet, während man im Raum Freiburg nur bei etwa 13 % der Hauskatzen Antikörper gegen *B. henselae* finden konnte (77,125,126). In Deutschland wurde eine Studie über die Seroprävalenz von Katzen in Nord- und Süddeutschland durchgeführt, hierbei mit mehr seropositiven Katzen im Norden. Dieses Ergebnis wurde mit

möglichen klimatischen und geografischen Einflüssen auf die Verteilung von *B. henselae* in Verbindung gebracht (55). Hingegen konnte in den USA gezeigt werden, dass die Prävalenz von Katzenflöhen mit einem warmen und feuchten Klima korreliert (65). Bei Zecken, die als Überträger der Borreliose eine große Rolle spielen, konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Das Krankheitsbild der Borreliose tritt ebenfalls vermehrt in warmen Gebieten auf, v.a. im Sommer und im Herbst. Zecken wird inzwischen ebenfalls eine Beteiligung an der Transmission von *B. henselae* zugeschrieben (128).

Unter gesunden Blutspendern liegt die Seroprävalenz von anti-*Bartonella* Antikörpern je nach Bewertungsgrenze und geografischer Lage bei ~5-30 % (1), so dass *Bartonella*-Erkrankungen als eine häufige Infektionserkrankung einzustufen sind. *Bartonella*-Infektionen sind in Deutschland in 13 % der Fälle Ursache unklarer Halslymphknotenschwellungen (114). In den USA kommt es jährlich zu 24.000 Fällen mit KKK, von denen etwa 2.000 stationär aufgenommen und behandelt werden müssen (62).

1.1.4 Diagnostik und Therapie

Die bestevaluierte Diagnostik einer Infektion mit *B. henselae* stellt der serologische Nachweis von Antikörpern mittels indirekten Immunfluoreszenztests dar. Bei Patienten mit KKK konnte so in 88 % der Fälle serologisch Antikörper nachgewiesen werden, in der Kontrollgruppe hatten lediglich 3 % der gesunden Probanden einen positiven Befund, der durch einen Titer >1:64 definiert ist (108). Alternativ ist ein DNA-Nachweis des Erregers mittels PCR-Amplifikation und anschließender Hybridisierung oder 16S-rRNA-Gen-Sequenzierung aus frischen oder formalinfixierten Gewebebiopsaten möglich (5,43,95).

Bei klinischem Verdacht einer BA erfolgt der Nachweis aus Biopsaten entsprechender Hautläsionen, die kulturelle Anzucht des Erregers ist allerdings sehr zeitaufwendig und schwierig. Ähnliche Probleme verursacht die Erregeranzucht in Zellkultur (17).

Komplikationslose Verläufe der KKK sind i.d.R. selbstlimitierend und werden lediglich symptomatisch, d.h. fiebersenkend und schmerzstillend behandelt. Treten Komplikationen auf, werden die besten Resultate durch eine fünftägige Behandlung mit Azithromycin erreicht. Mittel der ersten Wahl bei BA ist Clarithromycin oder Azithromycin, aber auch Erythromycin, Doxycyclin und Ciprofloxacin werden zur Behandlung eingesetzt, die maximale Therapiedauer liegt bei drei Wochen (124). Tritt die Erkrankung bei Immunsupprimierten auf oder kommt es zu Rückfällen, ist eine längere Antibiotikagabe indiziert (13). Entscheidend für die Antibiotikawirkung ist die maximal intrazellulär erreichbare Wirkstoffkonzentration, weswegen Makrolidantibiotika oder Tetracycline wie Doxycyclin bevorzugt zum Einsatz kommen.

1.1.5 *Bartonella* Adhäsion A (BadA)

Einige gramnegative Bakterien besitzen sog. Trimere Autotransporter-Adhäsine (TAAs) an ihrer Oberfläche. Diese stellen wichtige Pathogenitätsfaktoren dar und spielen eine bedeutende Rolle bei der Adhäsion an Wirtszellen. Typischerweise bilden TAAs trimere Oberflächenstrukturen mit einer Kopf-Stiel-Anker Architektur („*head-stalk-anchor*“) (84), die ein pilusartiges Aussehen aufweisen, allerdings einen anderen Aufbau besitzen (60). Eine wichtige Aufgabe der TAAs ist vermutlich die Anpassung der Erreger an spezielle ökologische Nischen.

Yersinia Adhäsion A (YadA) von *Yersinia enterocolitica* ist zurzeit das bestuntersuchte Adhäsion und somit der Prototyp unter den TAAs. Es besteht aus einer N-terminalen globulären Kopfdomäne („*head*“), einem als „*neck*“ bezeichneten Trimerisierungsmotiv, einem Stiel („*stalk*“) gebildet durch eine „*coiled-coil*“-Struktur sowie C-terminal der Membran-Anker-Domäne („*membran anchor*“). YadA erfüllt alle Kriterien eines Autotransporters, d.h. es besitzt alle nötigen Informationen für seinen Transport zur äußeren Membran und zur Translokation durch diese.

Das hochmolekulare (~328 kDa) *Bartonella* Adhäsion A (BadA) konnte den TAAs zugeordnet werden (116) und weist Homologien zu YadA auf. Vor der Zuordnung zu den TAAs wurde BadA als Pilus-Struktur beschrieben (10,70).

Neben der Adhärenz an Komponenten der extrazellulären Matrix sowie an Endothelzellen ist BadA bedeutend für die Aktivierung einer proangiogenetischen Wirtszellantwort (116). Im Rahmen dieser proangiogenetischen Wirtszellantwort kommt es zur Aktivierung von *hypoxia inducible factor* (HIF)-1 und zur Sekretion von Zytokinen wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Adrenomedullin (ADM) und *insuline like growth factor binding protein-3* (IGFBP -3), deren Ausschüttung mit der Expression von BadA korreliert (67,117).

Vielfaches Passagieren von *B. henselae* führt zum Verlust der BadA-Expression. Dieses Ereignis wurde als Phasenvariation beschrieben (119), allerdings ist der genaue Mechanismus unbekannt. Der Begriff Phasenvariation beschreibt einen Vorgang des An- und Abschaltens der Expression bestimmter Phänotypen (58). Proteine mit Homologien zu BadA konnten in *B. quintana* als *variably expressed outer membrane proteins* (Vomps) (152) und in *B. vinsonii* als *Bartonella repeat proteins* (BrpA-C) (53) identifiziert werden.

1.2 Angiogenese

Die Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Kapillaren und Venolen beschreibt der Prozess der Angiogenese oder Arteriogenese (120). Dagegen findet bei der Vaskulogenese eine Ausbildung von Arterien und Venen aus endothelialen Vorläuferzellen statt und ist somit die Vorstufe der Angiogenese.

Angiogenese lässt sich in zwei Formen unterteilen, die mit „*sprouting*“ und „*nonsprouting*“ bezeichnet werden. „*Nonsprouting*“ beschreibt einen Vorgang, bei dem Fortsätze extrazellulärer Matrix bestehende Gefäße teilen (120). „*Sprouting*“ selbst läuft in unterschiedlichen Phasen ab. Zunächst aktivieren Stimuli wie Zytokine den Gefäßwachstums-Prozess. Zelluläre Matrix wird abgebaut, die vorhandenen Zellen ändern ihre Morphologie und wandern auf den Stimulus zu. Es kommt zur Proliferation der Zellen, sie adhären aneinander, bilden die einschichtige Endothelschicht und kleiden damit das Gefäßlumen aus. Die noch sehr unstablen Gefäße werden stabilisiert, indem

Endothelzellen Komponenten der extrazellulären Matrix sezernieren und schließlich Perizyten und Myozyten sich dem Gefäß anlagern (49).

Während der Embryogenese des Menschen hat die Angiogenese eine große Bedeutung, schließlich ist das kardiovaskuläre System das erste funktionierende Organsystem des menschlichen Körpers (120). Im ausgereiften Organismus findet man Angiogenese physiologischer Weise nur im Verlauf des weiblichen Menstruationszyklus, während der Schwangerschaft und bei Wundheilungsprozessen (23). Trifft man bei Adulten auf Angiogenese, spricht man von Neoangiogenese. Diese ist Kennzeichen verschiedenster Erkrankungen wie Tumoren, Metastasen, diabetischer Retinopathie, rheumatoiden Erkrankungen, Psoriasis oder Bazillärer Angiomatose (24,49-51,120).

Das Gefäßsystem gewährleistet den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen zu Zellen aus Geweben, die nicht mittels Sauerstoffdiffusion über die Körperoberfläche versorgt werden können. Die maximale Strecke für Sauerstoffdiffusion ist begrenzt, so dass Gewebe oder Tumoren ab einem Durchmesser von 100-200 μm Angiogenese induzieren müssen, um weiterhin mit Sauerstoff versorgt zu werden (24). Genetische Grundlage sind durch Hypoxie induzierbare Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise HIF-1, der das angioproliferative Genprogramm reguliert (104). Da das Wachstum jedes Tumors ein gleichzeitiges Wachstum von Blutgefäßen voraussetzt, können antiangiogenetische Therapien in der Tumortherapie zum Einsatz kommen (24,151).

Andererseits können degenerative Erkrankungen der Blutgefäße zu Erkrankungen wie der koronaren Herzerkrankung (KHK) oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) führen. Beide Krankheitsbilder führen zu Durchblutungsstörungen von Gewebe und damit zu einem Sauerstoff- und Nährstoffmangel. Möglicherweise könnte hier eine therapeutische Stimulation der Angiogenese konventionelle Therapieformen wie Bypass-Operationen ersetzen (83).

1.2.1 Bakteriell induzierte Angiogenese

Für *B. bacilliformis*, *B. quintana* und *B. henselae*, die Erreger von vaskuloproliferativen Erkrankungen wie *Verruga peruana*, BA und PH, konnte eine Induktion der Angiogenese beschrieben werden (52,76,94). Dabei stellen Endothelzellen wohl die Zielzellen einer *Bartonella*-Infektion in sämtlichen Reservoirwirten (auch im Menschen) dar (38).

Bisherige Versuche zeigen, dass *B. bacilliformis*, *B. quintana* und *B. henselae* im Verlauf einer Infektion in Endothelzellen eindringen (18,39,142), die intrazelluläre Replikation von *B. henselae* und *B. quintana* wurde nachgewiesen (18,69), wobei die Replikation von *B. henselae* in Endothelzellen schneller verläuft als auf unbelebten Standardnährböden (69).

Der klassische Invasionsprozess einer Bakterien-vermittelten Endozytose (41) als auch die Internalisation so genannter „Invasomen“ (39) konnte bisher die Invasion von *B. henselae* in Endothelzellen erklären. Dabei sammeln sich die Bakterien aktiv an einem Pol der Zelle, das gebildete Aggregat wird durch Umordnung des Aktin-Zytoskeletts eingehüllt und schließlich in die Zelle aufgenommen (39).

Durch *in-vitro*-Untersuchungen konnten mindestens drei verschiedene Mechanismen der Induktion vaskuloproliferativer Erkrankungen wie BA und PH durch *B. henselae* gefunden werden, die sich möglicherweise überlagern:

- (i) direkte Stimulation von Endothelzellproliferationsprozessen (21),
- (ii) Hemmung von Endothelzellapoptosemechanismen (71) und
- (iii) Aktivierung der Sekretion von vaskuloproliferativen Zytokinen (70).

Zu verstehen ist die Aktivierung der Endothelzellproliferation durch *B. henselae*, *B. quintana* und *B. bacilliformis* (32,52,86,101) möglicherweise als Pathogenitätsstrategie humanpathogener Bakterien, durch die sich der Erreger sein eigenes Habitat, das Endothel selbst, sichert. Demnach wäre eine Tumorinduktion durch *Bartonella* spp. darauf ausgerichtet, dem Bakterium selbst Wachstumsvorteile zu sichern.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Eigenschaft von *Bartonella* spp., vaskuloproliferative Krankheitsbilder zu verursachen, ist einzigartig unter humanpathogenen Bakterien. Eine besondere Rolle bei der Entstehung vaskuloproliferativer Erkrankungen kommt dabei vermutlich dem Trimeren Autotransporter-Adhäsin BadA zu, dessen Expression entscheidend für die Adhärenz der Bakterien an Endothelzellen und die nachfolgende Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort ist (116). Bekannt ist, dass vielfaches Passagieren von *B. henselae* zum Verlust der BadA-Expression führt, zugrunde liegende Mechanismen der Genregulation sind allerdings unbekannt. Möglicherweise wird die BadA-Expression durch veränderte Umweltbedingungen während der Transmission „Katze-Katzenfloh-Mensch“ beeinflusst. Umweltfaktoren, die sich im Katzenfloh vom Mensch unterscheiden, sind beispielsweise Sauerstoffkonzentration, Eisenverfügbarkeit und Umgebungstemperatur.

In dieser Arbeit sollten mittels *in-vitro*-Experimenten einige Bedingungen, die sich im Vektor (Floh) und Wirt (Mensch) unterscheiden, mit Hinblick auf Aktivierung oder Deaktivierung der *badA*-Expression untersucht werden.

Die Temperatur im menschlichen Blut ist mit 37 °C höher als die Temperatur im Katzenfloh, dagegen sind Sauerstoffkonzentration und Eisenverfügbarkeit im Katzenfloh höher als im Menschen (11). Deswegen wurden die Auswirkungen von Temperaturbedingungen (27 °C, 30 °C, 37 °C und 42 °C) auf die BadA-Expression untersucht. Zur Untersuchung der Rolle von Eisen wurden Blutagarplatten mit unterschiedlichen DFO-Mengen präpariert und schließlich die Bakterien bei 2 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM und 25 µM DFO kultiviert. Um einen möglichen Einfluss der unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen zu untersuchen, wurden zudem Bakterien bei 2 % oder 21 % Sauerstoff angezüchtet. Die Luftfeuchtigkeit von 90 % und der CO₂-Gehalt von 5 % waren bei allen Versuchen gleich. Um eine Aktivierung des *badA*-Gens durch Zellen zu untersuchen, wurden jeweils Endothelzellen oder Insektenzellen mit *B. henselae* infiziert. Nach Inkubation unter den oben genannten Bedingungen

wurde die BadA-Expression mittels IFT, Western Blot und RT-PCR quantitativ untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Anaerobiertopf	E. Merck, Darmstadt
Analysewaage BP610, PT1200	Sartorius, Göttingen
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
Eismaschine	Scotsman, Vernon Hills, USA
Elektronenmikroskop Philips CM10	Philips, Hamburg
Entwicklerkassette	Cawo, Schrobenhausen
Eppendorfpipetten und Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Filmentwickler Curix 60	AGFA, Leverkusen
Fotokamera Olympus und Dunkelhaube DH 30/32	Olympus, Hamburg
Gelelektrophorese Kammern und Zubehör	Biostep, Jahnsdorf BioRad, München
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Heizblock DriBlock DB-2A	Techne, Staffordshire, GB
Konfokales Laserscan-Mikroskop (CLSM)	Leica, Bensheim
Leica DM IRE 2	
LightCycler®	Roche, Mannheim
Mikroskope	Zeiss, Jena
Mikrowellenherd	Panasonic, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen
Photometer:	
Ultrospec 3000 pro	Eppendorf, Hamburg
Ultrospec 2100 pro	Amersham Bioscience Piscataway, USA
Pipettus (-Akku)	Hirschman, Fluorn-Winzeln

Plattenschüttler	Multimed Wicker, Kirchheim/Teck
Quarzglas QS Küvetten	Hellma, Müllheim
Rüttler eppendorf mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
Spannungsquellen für Gel- elektrophoresen	BioRad, München
Sterilbank HERAsafe	BDK, Sonnenbühl
Vortexer:	
Julabo Paramix 3	Julabo, Seelbach
Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifugen:	
Sigma 1K 10	Sigma, Osterode am Harz
Sigma 3K 30	Sigma, Osterode am Harz
Mini Spin plus	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau

2.1.2 Plastik- und Verbrauchsmaterialien

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

Anaerobierbeutel	Oxoid, Hampshire, GB
Autoradiografiefilme (Kodak X-OMAT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Einmalküvetten	Sarstedt, Berlin
Facs-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Impfschlinge weiß 1 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Impfschlinge blau 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Kanüle, Microlance 3	BD, Drogheda, Irland
Latexhandschuhe DermaClean	Ansell, München
LightCycler® Kapillaren	Roche, Mannheim

Nitril-Handschuhe	Kimberly Clark, Koblenz
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll, Dassel
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
Pasteurpipetten	Hilgenberg, Malsfeld
Pipettenspitzen weiß 0,1-20 µl kurz	Plastikbrand, Wertheim
Pipettenspitzen weiß 0,5-20 µl lang	Plastikbrand, Werheim
Pipetten steril	Costar, Corning NY, USA
1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	
Spritze, Luer-Lok™ Tip 3 ml	BD, Tense, Belgien
Sterilfiltertips 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym, Hess. Oldendorf
Wattestäbchen MSP	Schmeiser, Horb/Neckar
Whatman Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.3 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Ampuwa	Fresenius Kabi
APS	AppliChem, Darmstadt
Chloroform ultrapure	AppliChem, Darmstadt
DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole-2 HCL)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Western Blot Detektionssystem	Amersham Pharmacia
EDTA	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ethanol absolut	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
FCS	Sigma-Aldrich, Hamburg
Fluoprep	BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich

Formaldehyd	AppliChem, Darmstadt
Formamid	Ambion, Wiesbaden
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kollagen G	Biochrom, Berlin
LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sucofin, Düsseldorf
Magnesiumchlorid	Ambion, Wiesbaden
Nuclease free water	Ambion, Huntingdon, UK
PBS (+ CaCl ₂ /MgCl ₂)	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S Lösung	Serva, Heidelberg
SDS ultrapure	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tris	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
1 mM Natriumcitrat pH 6,4	Ambion, St. Austin, USA

2.1.4 Enzyme

DNase I	Roche, Mannheim
DNase Inaktivator	Ambion, Wiesbaden
RNasin Plus RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim

2.1.5 Kits

MicrobEnrich	Ambion, Wiesbaden
SYBR Green I	Roche, Mannheim

2.1.6 Oligonukleotide für PCR-Untersuchungen

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

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')	Herkunft	Referenz
GyrB f1	GTA TAT CGG CGA TAC AGA TGA TGG	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
GyrB f2	TTG TAG ACA ACG CTA TTG ATG AAG C	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
GyrB r1	CCA TCA GCA TGA AGT GTC ACG	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
GyrB r2	CCT TCT GTT GGA TGA ATA TCG G	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
GyrA f1	AGG ATA ATT ATG ATG GAC GTG AGC	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
GyrA f2	GTG AAC CGG TAG TCT TAC CAG C	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
GyrA r1	AGG CGA TAC AAG CAT CAA GG	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
GyrA r2	TCG GGA TTA TCA ATC AAG GC	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
rpsL f1	CCT ACC GTA AAT CAG TTG ATT CG	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
rpsL f2	CCA ATT AAG CGT AAT AAG GTT CC	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
rpsL r1	GAG CAG AAT TTG GTT TCT TCG	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
rpsL r2	CAA ATC CAT TTG TCA AAC GG	Metabion, Martinsried	diese Arbeit
BadA Klon42r3	GAT CCC TAG CGA CAT CAA AGG	Metabion, Martinsried	Dr. Tanja Riess, unpubliziert
BadA f6	AAA GCA TTA AGG GGA ATG ATA TCA G	Metabion, Martinsried	(116)
BadA r8	TGA TAT CAT GGA TCC TTA TGC TTT TAG CTG TGC	Metabion, Martinsried	(116)
BadA Klon42f3	GGG CAT TAG AGG TTA TGA TCC	Metabion, Martinsried	Dr. Tanja Riess, unpubliziert

2.1.7 Antikörper

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

Bezeichnung	Verwendung	Verdünnung	Herkunft	Referenz
Anti-BadA (Kaninchen)	Western Blot IFT	1:2.000 1:250	-	(116)
Anti-Kaninchen-IgG-FITC (Ziege)	IFT	1:100	Dianova, Hamburg	-
Anti-Kaninchen-Ig-HRP (Schwein)	Western Blot	1:1.000	Cell Signalling Technology, Danvers, USA	-

2.1.8 Größenstandards

Page Ruler Protein Ladder

Fermentas, St. Leon-Rot

50 bp Ladder

Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.9 Antibiotika

Penicillin/Streptomycin

Biochrom, Berlin

Kanamycin Plättchen (30 µg)

Oxoid, Wesel

2.1.10 Bakterienstämme

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

Bakterienstamm	Charakteristika	Referenz
<i>B. henselae</i> Marseille WT	Patientenisolat, niedrige Passage-Nummer, BadA positiv	(42)

2.1.11 Verwendete Zellen

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

Zell-Linie	Zelltyp	Kulturmedium	Infektionsmedium
HUVEC	Humane venöse Nabelschnurendothel-zellen	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i> (PromoCell Mannheim)	<i>Endothelial Cell Basal Medium</i> (PromoCell, Mannheim)
Schneider-Zellen	Epithelzelle einer embryonalen <i>Drosophila melanogaster</i> Zelllinie	<i>Schneider's Drosophila Pulvermedium</i> (Serva Electrophoresis)	<i>Schneider's Drosophila Pulvermedium</i> (Serva Electrophoresis)

2.1.12 Medien

Columbia Blutagarplatten

Becton Dickinson,
Heidelberg

LB (Luria Bertani)-Medium

5 g NaCl
5 g Hefeextrakt
10 g Trypton
ad 1000 ml H₂O_{bidest}
pH 7,4-7,6

Einfriermedium für Bakterien

20 % Glycerol in LB-Medium

Endothelzellmedium (Kultur)

PromoCell, Mannheim

Endothelium Cell Growth Media
+ Supplement Mix
+ 10 % fetales Kälberserum (FCS)
+ 100 U/ml Penicillin
+ 100 µg/µl Streptomycin

Endothelzellmedium (Infektion)	PromoCell, Mannheim
Endothelium Cell Basal Medium	
Insektenzellmedium (Kultur)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Schneider's Drosophila Pulvermedium	
ad 1000 ml H ₂ O	
+ 0,6 g CaCl ₂	
+ 0,4 g NaHCO ₃	
pH 6,5	
+ 100 ml FCS	
+ 10 ml 200 µM L-Glutamine	
+ 100 U/ml Penicillin	
+ 100 µg/µl Streptomycin	
Insektenzellmedium (Infektion)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Schneider's Drosophila Pulvermedium	
ad 1000 ml H ₂ O	
+ 0,6 g CaCl ₂	
+ 0,4 g NaHCO ₃	
pH 6,5	
+ 100 ml FCS	
+ 10 ml 200 µM L-Glutamine	

2.1.13 Puffer und Stammlösungen

- a) Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Laemmli Puffer (SDS-Probenpuffer 5x)

312,5 mM Tris/HCL (pH 6,8)
 50 % Glycerin
 10 % SDS
 250 mM DTT
 0,5 % Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer

50 mM Tris
384 mM Glycin
0,1 % SDS
ad 1000 ml H₂O

Lösung für Sammelgel (2 Gele)

500 µl 30 % Acrylamid-Stammlösung
380 µl 1,5 M Tris pH 6,8
30 µl 10 % SDS
30 µl 10 % APS
3 µl TEMED
2,1 ml H₂O

Lösung für 8 %-iges Trenngel (2 Gele)

2,7 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung
2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8
100 µl 10 % SDS
100 µl 10 % APS
6 µl TEMED
4,6 ml H₂O

Lösung für 12 %-iges Trenngel (2 Gele)

4,0 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung
2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8
100 µl 10 % SDS
100 µl 10 % APS
4,0 µl TEMED
3,3 ml H₂O

Blot-Puffer (10x)

25 mM Tris
192 mM Glycin
ad 1000 ml H₂O

Waschpuffer (10x)

10 mM Tris/HCL pH 7,4
0,15 mM NaCl
0,2 % Tween 20
ad 2000 ml H₂O

Blockpuffer

5 % Magermilch

b) Lösungen zum Entwickeln eines Western Blots via *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) Detektion

Luminol

0,22 g Luminol
ad 5 ml DMSO

Cumarinsäure

0,075 g Cumarinsäure
ad 5 ml DMSO

Lösung 1

250 µl Luminol
220 µl Cumarinsäure
ad 25 ml Tris/HCL
(100 mM, pH 8,5)

Lösung 2

15 µl H₂O₂ (30 %)
ad 25 ml Tris/HCL
(100 mM, pH 8,5)

c) Lösungen für Northern-Gelelektrophorese

MOPS (10x)

200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
pH 6,7

Probenpuffer

750 μ l Formamid
150 μ l 10x MOPS
262 μ l Formaldehyd
5 μ l Ethidiumbromid (10 μ g/ μ l)

Lösung für Gel

0,8 g Agarose
68 ml Ampuwa
8 ml 10x MOPS
4 ml Formaldehyd

d) Agarosegel

50x TAE

242 g Tris
57,1 ml Essigsäure 100 %
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1000 ml Aqua_{bidest}

Gel

80 ml 1x TAE
2,4 g Agarose
8 μ l Ethidiumbromid

Blue juice (DNA Ladepuffer)

5 ml Glycerin 50 %
200 μ l 0,5 M EDTA pH 8,0
25 mg Bromphenolblau
ad 10 ml Ampuwa

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterien

Zur RNA-Isolierung und für Infektionsexperimente wurde *B. henselae* WT verwendet.

2.2.1.1 Bakterienanzucht und Kultivierung für *in-vitro*-Experimente

Zur Kultivierung wurden jeweils 100 µl Bakteriensuspension pro Columbia-Blutagarplatte mit 5 % Schafsblut ausplattiert und anschließend bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit über 3, 5 und 7 Tage kultiviert. Für Versuche zur Untersuchung der BadA-Expression in Abhängigkeit der Temperatur wurden obige Bedingungen gleich gehalten, jedoch die Inkubationstemperatur auf 27 °C, 30 °C bzw. 42 °C geändert.

Hypoxieversuche wurden ebenfalls unter den oben genannten Einstellungen durchgeführt, die atmosphärische Sauerstoffkonzentration wurde allerdings auf 2 % gesenkt. Für Experimente zum Eisenentzug wurde DFO auf Columbia-Blutagarplatten ausplattiert, um Endkonzentrationen von 2 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM und 25 µM zu erreichen.

2.2.1.2 Herstellung von Bakterienstocks

Der jeweilige Bakterienstamm wurde auf Columbia-Blutagarplatten kultiviert, nach 5 d mit Wattestäbchen abgeerntet und in PBS suspendiert. Anschließend wurden die Bakterien mit PBS gewaschen, in Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Auf Columbia-Blutagarplatten ausplattierte serielle Verdünnungsreihen dienten der Bestimmung der Bakterienanzahl und wurden nach 14 d ausgezählt.

2.2.1.3 Testung neuer Bakterienmedien

In Zellkulturflaschen (80 cm²) wurde 15 ml Medium vorgelegt. Als Medien dienten basales Endothelzellmedium, Insektenmedium mit 4x10⁶ Schneider-Zellen, konditioniertes Insektenmedium aus dem Überstand einer Schneider-Zell-Kultur und frisches Insektenmedium (jeweils ohne Penicillin/Streptomycin-Zusatz). Jeder Ansatz wurde mit 1,3x10⁸ Bakterien beimpft und bei 30 °C, 5 %

CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Täglich wurden die Bakterienlösungen resuspendiert und anschließend 1 ml aus der Kultur entnommen. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe von 1:10¹ bis 1:10⁸ hergestellt und diese auf Columbia-Blutagarplatten ausplattiert. Nach 14-tägiger Inkubation der Platten bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchte wurden die gewachsenen Kolonien (CFU: *colony forming unit*) ausgezählt und eine Wachstumskurve erstellt.

2.2.2 Zellkultur

Für die Zellkulturexperimente dieser Arbeit wurden humane Endothelzellen (HUVECs: *human umbilical vein endothelial cells*) sowie Schneider-Zellen verwendet.

2.2.2.1 Kultivierung von Endothelzellen

Zellkulturen wurden grundsätzlich unter sterilen Bedingungen bearbeitet. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Zellkulturbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte. Für Endothelzellen wurden Zellkulturflaschen mit Kollagen G beschichtet. Dazu wurde Kollagen G in einem Verhältnis von 1:40 mit PBS verdünnt und schließlich in einer Konzentration von 0,1 mg/ml über Nacht auf die Flaschenböden aufgebracht. Nach Absaugen des Kollagens am nächsten Tag wurden die beschichteten Zellkulturflaschen bei 4 °C gelagert.

Nach dem Auftauen wurden Endothelzellen in die kollagenisierten Zellkulturflaschen (80 cm²) ausgesät und mit 12 ml Medium kultiviert. Nach Adhärenz der Zellen am Flaschenboden bildete sich innerhalb weniger Tage ein konfluenter Zellrasen aus. Um adhärente Zellen vom Flaschenboden abzulösen, wurde zunächst das Medium abgesaugt und anschließend die Zellen mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA kurz gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Danach wurde die Kultur für 2-5 min mit Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Durch das Trypsin werden Adhäsionsproteine der Zelloberfläche gespalten, was zum Ablösen der Zellen vom kollagenisierten Boden führt. Die Wirkung des Trypsins wird durch Zugabe des 3-4fachen Volumens an Zellkulturmedium aufgehoben. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:20 gesplittet und das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

2.2.2.2 Kultivierung von Insektenzellen

Schneider-Zellen wurden in Zellkulturflaschen (80 cm²) ausgesät und in 15 ml Medium inkubiert. Um ein optimales Wachstumsverhalten zu beobachten, wurden die Zellen ihrer log-Phase entsprechend auf 2×10^6 pro ml bis 4×10^6 pro ml gesplittet, da ab 6×10^6 Zellen pro ml Schneider-Zellen in eine stationäre Wachstumsphase übergehen.

Beobachtungen zufolge wachsen die Insektenzellen besser in Medium, das zu gleichen Teilen aus konditioniertem und frischem Medium besteht. Möglicherweise liegt diesem Phänomen eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren der Zellen in ihre Umgebung zu Grunde. So wurden die Insektenzellen bei jedem Splittvorgang in ein 1:1-Gemisch aus altem und frischem Medium aufgenommen. Die ersten 1-2 Tage nach einem Splittvorgang konnte Zelladhärenz am Boden der Zellkulturflasche beobachtet werden, im Laufe der weiteren Inkubation lösten sich die Zellen vom Flaschenboden ab und lagen schwimmend im Medium vor. Schneider-Zellen können bis Passage-Nummer 30-40 in Versuchen eingesetzt werden.

2.2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Anzahl der lebenden Zellen in Kultur zu bestimmen, wurde ein kleines Volumen der Zellsuspension 1:10 mit Trypan-Blau verdünnt. Durch Auszählen der äußeren vier Eckquadrate in einer Neubauer Zählkammer wurden die vitalen, ungefärbten Zellen bestimmt. Der Mittelwert der vier Eckquadrate wurde gebildet und mit dem Kammerfaktor (1×10^4 /ml) und dem Faktor der Verdünnung mit Trypan-Blau multipliziert; somit erhielt man die Zellanzahl pro ml Zellsuspension. Für Infektionsexperimente mit Schneider-Zellen durften max. 10 % tote Zellen vorliegen.

2.2.2.4 Infektionsexperimente

Am Tag vor der geplanten Infektion wurden die Endothelzellen vom Boden der Zellkulturflaschen wie oben beschrieben abgelöst und mittels Trypan-Blau die Anzahl der lebenden Zellen pro ml bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in definierter Menge in neue kollagenisierte Zellkulturflaschen ausgesät. Am Versuchstag wurde zwei Stunden vor Infektion das Zellkulturmedium

abgenommen und durch antibiotikafreies Medium ersetzt. Nach Berechnung der benötigten Konzentration Bakterien pro Zelle wurde die gewünschte Anzahl Aliquots an *B. henselae* - Bakterienstocks aufgetaut, bei 3.500 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und in antibiotikafreiem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Infektionsexperimente dieser Arbeit wurden mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 260 und 750 durchgeführt. Um die Bakterien-Zell-Kontakte zu verbessern, wurden die Zellkulturflaschen nach Infektion für 5 min bei 1.300 rpm und RT zentrifugiert und schließlich im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Für Infektionsversuche mit Insektenzellen wurden die Zellen in antibiotikafreiem Medium gehalten, nach 2-3maligem Passagieren konnte von Antibiotikafreiheit ausgegangen werden. Die MOI betrug bei Schneider-Zellen 40.

2.2.3 Methoden zum Proteinnachweis

Zum Nachweis des BadA-Proteins wurden in dieser Arbeit das Western Blot Verfahren sowie der Nachweis durch IFT gewählt. In diesem Verfahren können Proteine mit einer sehr spezifischen und sensitiven Antikörperreaktion nachgewiesen werden.

2.2.3.1 Proteingewinnung für Western Blot

Eine Columbia-Blutagarplatte mit *B. henselae* wurde mit einem Wattestäbchen abgeerntet und in 2 ml PBS resuspendiert. In Einmalplastikküvetten wurde die Suspension 1:10 verdünnt eingefüllt, die optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550$ nm gemessen und durch Zugabe von PBS auf OD = 1,0 eingestellt. Nach 1 min Zentrifugieren bei 14.500 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet im halben Volumen von 2x Laemmli-Puffer aufgenommen (z.B. OD_{1,0} bei 500 μ l Volumen OD_{1,0} = 1:250 μ l 2x Laemmli). Das entstandene Bakterienlysat wurde für 3 min auf 98 °C erhitzt, abzentrifugiert und bei -20 °C eingefroren oder direkt in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese besteht darin, Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihren unterschiedlichen Massen

aufzutrennen. SDS ist ein anionisches und amphiphatisches Detergens, das im Verhältnis 1:1,4 pro Aminosäure an die kationischen Reste von Proteinen bindet und ihnen somit eine negative Überschussladung verleiht. Diese Überschussladung verhält sich proportional zur Größe der Proteine und macht die eigene Ladung der Proteine vernachlässigbar. Gleichzeitig nehmen SDS-denaturierte Proteine eine stäbchenartige Konformation ein, die den Einfluss der nativen Oberflächenstruktur auf die Wanderungseigenschaften der Proteine aufhebt. Sie wandern demnach im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihr Laufverhalten während der Elektrophorese nur von ihrer Größe abhängt.

Proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes (33) werden die Proteine im Gel aufgetrennt, wobei der Trennbereich über die Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration kontrolliert werden kann. Diese kann zwischen 2 % und 30 % variieren und bestimmt die Porengröße des Gels. Um sehr große Proteine aufzutrennen, werden niedrigprozentige Gele verwendet. Je kleiner das Protein ist, umso höherprozentig und damit vernetzter sollte das Gel sein. Zur BadA-Darstellung wurden 8 %-ige und 12 %-ige Gele verwendet.

Jedes Gel besteht aus zwei Komponenten, dem Trenngel und dem Sammelgel, die nacheinander hergestellt wurden. Begonnen wurde mit dem Trenngel, das in eine Vertikalkammer gegossen wurde, bis diese zu $\frac{3}{4}$ gefüllt war. Um eine glatte Trennfläche zu erhalten und übliche Verdunstung zu verringern, wurde das Gel mit 70 %-igem Ethanol überschichtet. Nach halbstündiger Polymerisation des Trenngels wurde der Ethanolüberstand entfernt, das Sammelgel in das verbliebene Volumen der Gelkammer gegossen und unverzüglich ein Kamm eingesetzt. Nach ebenfalls halbstündiger Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in das Elektrophoresesystem eingesetzt, der Kamm entfernt und die Geltaschen mit Hilfe einer Kanüle gespült. Pro Tasche wurde 10 μ l der zu analysierende Probe eingesetzt und als Marker wurden 5 μ l *ruler page protein ladder* aufgetragen. Die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (79) wurde in 1x Laufpuffer und bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel durchgeführt.

2.2.3.3 Western Blot

Aufgrund ihrer negativen Ladung durch gebundenes SDS können mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Das SDS wird im Laufe des Transfers abgetrennt. Die übertragenen Proteine können im Anschluss durch eine spezifische und sensitive Antikörperreaktion nachgewiesen werden, bei der bis zu 0,1 ng Protein detektiert wird (141). Für den Proteintransfer wurden Gel und Membran aufeinander gelegt und von beiden Seiten mit je einer Lage Whatman-Filterpapier und je einem Schwamm bedeckt. Dieser Aufbau wurde anschließend in eine BioRad Blotkammer eingesetzt, das restliche Volumen der Blotkammer mit Blot-Puffer aufgefüllt und eine konstante Stromstärke von 300 mA für eine Stunde angelegt.

Nach erfolgtem Blot wurde die Effizienz des Transfers durch reversible Färbung mit Ponceau Rouge S Lösung überprüft. Dieser Farbstoff ist durch Waschen der Membran mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ wieder zu lösen. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran für 2 h in Blockierungspuffer auf einem Gelschüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde sie über Nacht mit dem Primärantikörper (anti-BadA) 1:1.000 in Blockpuffer verdünnt bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst dreimal für 5 min bei RT mit Waschpuffer gewaschen und schließlich für 1 h bis maximal 2 h mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Sekundärantikörper 1:2.000 in Blockpuffer verdünnt auf einem Gelschüttler inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit Waschpuffer bei RT wurde die Membran mit ECL-Reagenz versetzt, zwischen zwei Projektorfolien und anschließend in eine Entwicklerkassette gebracht. Für einige Sekunden bis höchstens eine Minute wurde im Dunkeln ein Röntgenfilm auf die Folien gelegt, um die Chemielumineszenz zu detektieren.

2.2.3.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie / konfokale Laserscanningmikroskopie

Grundlage dieser Methode ist die Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. An die Antikörper ist ein fluoreszierender Farbstoff gekoppelt, über den z.B. bakterielle Oberflächenproteine detektiert werden können. Zum Nachweis der BadA-Expression wurde ein wenig Bakterienrasen von einer Columbia-Blutagarplatte abgenommen und die Bakterien in 500 µl PBS resuspendiert. 30 µl der Suspension wurden auf einen Objektträger gebracht und bei RT getrocknet. Anschließend kam der Objektträger in eine feuchte Kammer und die getrocknete Suspension wurde bei 4 °C über 10 min mit 3,75 % PFA fixiert. Danach wurde dreimal mit PBS in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gewaschen. Als Primärantikörper wurde mit anti-BadA (1:250) für eine Stunde bei RT inkubiert und nachfolgend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Als nächster Schritt folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper FITC-*anti-rabbit* (1:100) für 45 min im Dunkeln bei RT. Zur DNA-Darstellung wurde DAPI (1 µg/ml) eingesetzt (5 min bei 4 °C), danach erfolgt erneut dreimaliges Waschen mit PBS und anschließend wurde der Objektträger mit Fluoprep beschichtet, einem Deckgläschen bedeckt und mit farblosem Nagellack versiegelt. Mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie wurden die Proben auf BadA-Expression hin untersucht und ausgewertet. Das konfokale Laserscanningmikroskop ermöglicht die Aufnahme von 3-dimensionalen Bildern, die Aufschluss über die Verteilung sowie die Menge eines markierten Proteins geben. Die verwendete „*glow-mode*“-Einstellung gibt in Falschfarbendarstellung eine quantitative Aussage über die Protein-Menge, wobei die Intensität von grün (wenig Protein) bis rot (viel Protein) reicht.

2.2.3.5 Elektronenmikroskopie

Nach siebentägigem Wachstum von *B. henselae* auf einer Blutagarplatte wurde die Bakterienkultur mit 2,5 % Glutaraldehyd in PBS über 15 min bei 37 °C fixiert und über weitere 24 h bei 4 °C gelagert. Die fixierten Bakterien wurden in 2 %-iger Agarose eingebettet und anschließend Quader mit einem Millimeter Kantenlänge ausgeschnitten. Zur weiteren Fixierung (1 h auf Eis) diente 1 %

Osmiumtetroxid in 100 mM PO₄-Puffer (pH 7,2), anschließend wurde mit H₂O_{bidest} gespült. Danach wurde die Fixierung mit 1 %-igem wässrigen Uranylacetat für 1 h bei 4 °C fortgeführt, das Präparat mehrfach in Ethanol gewaschen und schließlich in Epoxydharz eingebettet. Zur Einfärbung diente 1 %-iges wässriges Uranylacetat und Bleizitrat. Die Analyse wurde mit dem Elektronenmikroskop CM10 von Philips mit einem 30 µm Objektiv bei 60 kV durchgeführt (Kooperation mit Dr. H. Schwarz, MPI Tübingen).

2.2.4 RT-PCR

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Pro Ansatz wurden zehn Columbia-Blutagarplatten, auf denen über 3 d, 5 d oder 7 d *B. henselae* kultiviert wurde, abgeerntet und die Bakterien in *Nuclease-free-water* resuspendiert. Nach Zentrifugation der Suspension bei 4.000 rpm für 3 min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml Trizol gründlich resuspendiert. Trizol ist ein Einphasenreagenz aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, das RNA stabilisiert und gleichzeitig Zellen sowie Zellbestandteile zerstört. Durch Trizol isolierte RNA ist frei von Proteinen und DNA. Zur Abtrennung der RNA wurde dem Homogenisat 200 µl Chloroform zugegeben, 30-60 sec durch Schwenken gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Chloroform trennt das Gemisch in eine obere wässrige Phase, die die RNA enthält und eine untere organische Phase. Nach Zentrifugation bei 12.000 g für 15 min bei 4 °C wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß mit bereits vorgelegten 500 µl Isopropanol überführt und die Präzipitation der RNA erfolgte innerhalb 10 min bei RT. Das Präzipitat wurde für 30 min bei 4 °C und 12.000 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen, anschließend wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut mit 7.500 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Lufttrocknung des RNA-Pellets wurde es in 50 µl Natrium-Citrat gelöst und für 10 min bei 55 °C inkubiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl des RNA-Natrium-Citrat-Gemisches 1:200 verdünnt und photometrisch bei A_{260/280} gemessen, dabei sollte die Ratio für RNA zwischen 1,6-1,8 liegen. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C

eingefroren oder direkt weiterverarbeitet. Längerfristige RNA-Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.4.2 DNA-Verdau und PCR

Für die quantitative RT-PCR wurden 5 µg der Gesamt-RNA in soviel PCR-Wasser aufgenommen, dass ein Endvolumen von 50 µl vorlag. Eventuell vorhandene DNA musste durch Verdau entfernt und zusätzlich RNAsen inaktiviert werden. Dazu wurden 10 µl MgCl₂, 2 µl DNase I und 1 µl RNAsin[®] Plus RNase Inhibitor zugefügt und 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch 6 µl DNase-Inaktivierungsreagenz abgebrochen. DNase I verdaut einzel- und doppelsträngige DNA zu Oligodesoxyribonukleotiden. Die Aktivität der Ribonuklease wird auf nicht messbares Niveau reduziert. RNAsin[®] Plus RNase Inhibitor inaktiviert eukaryontische RNAsen (z.B. RNase A und B) die zufällig die isolierte RNA kontaminiert haben könnten und stabilisiert so die bakterielle RNA. Das Gemisch wurde abzentrifugiert und der Überstand, der die gereinigte RNA enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur RNA wurde frisch angesetzter Mastermix hinzu pipettiert, der in einem Arbeitsschritt die RNA in cDNA umschreibt und die Amplifikation im LightCycler[®] startet, auch als „*single-step*“-Methode bezeichnet.

1x Mastermix:

H ₂ O	4,2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	0,5 µl
SYRmix	2,0 µl
Enzym	0,2 µl
RNA (1:10 verdünnt)	1,0 µl

2.2.4.3 Grundlagen der Methode

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient dazu, einen bestimmten Genabschnitt mittels spezifischer Oligonukleotide (Primer) und DNA-

Polymerase zu amplifizieren. LightCycler® erlaubt neben sehr schnellen Zykluszeiten für die PCR eine gleichzeitige *online* und *realtime* Detektion der Reaktionskinetik. Die schnellen Zykluszeiten werden durch sehr effiziente Aufheiz- und Abkühlungsprozesse erreicht. Da Glaskapillaren mit einem sehr günstigen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen als Reaktionsgefäße dienen, wird die gewünschte Temperatur im Reaktionsansatz binnen Millisekunden gewährleistet.

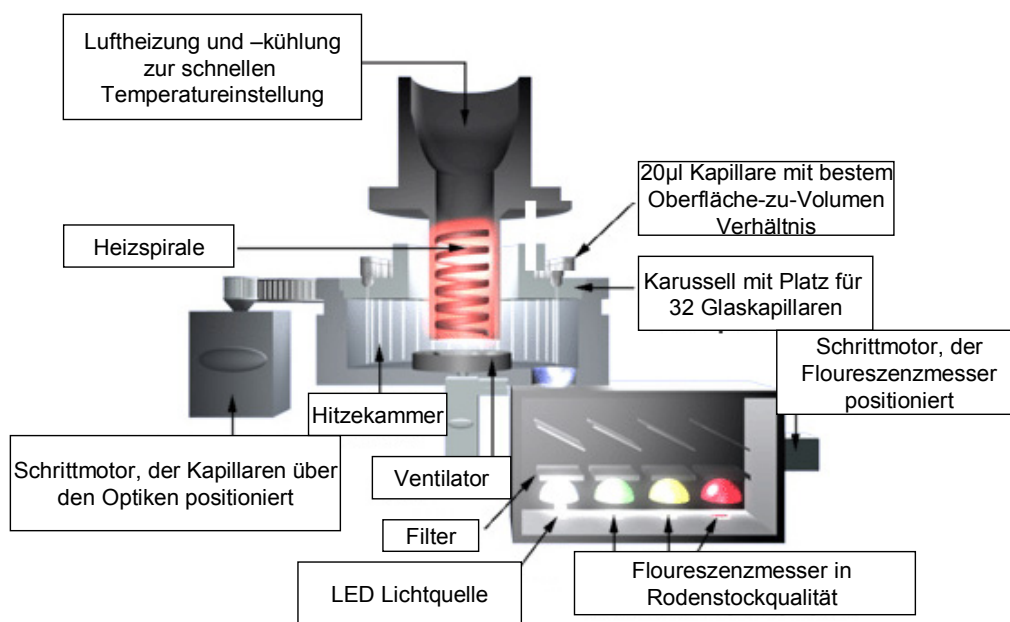


Abb. 5: Aufbau LightCycler® (Roche). (http://www.bmskorea.co.kr/bms_product/makerimage/roche/Genomics%20Systems/lightcycler-1.jpg).

Im LightCycler® System (s. Abb. 5) kommt der DNA-Farbstoff SYBR Green I häufig zur Anwendung, da dessen Spezifität und Sensitivität höher ist als bei Ethidiumbromid und nur Signale erzeugt werden, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden vorliegt. Mittels „*single-step*“ Methode wird die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und diese schließlich amplifiziert. Die DNA liegt in der Denaturierungsphase als Einzelstrang vor (s. Abb. 6), SYBR Green I kann sich zu diesem Zeitpunkt nicht anlagern und das Fluoreszenzsignal ist schwach. Während des *Annealing* hybridisieren die Primer an die Zielsequenz, somit liegt vereinzelt doppelsträngige DNA vor, an die der Farbstoff binden kann. Während der Elongationsphase wird die DNA abgelesen und vervielfacht, was zu einer vermehrten Einlagerung des Farbstoffs führt. Am Ende der Elongationsphase

liegt praktisch die gesamte DNA doppelsträngig vor und das maximale Fluoreszenzsignal durch SYBR Green I wird erreicht. Durch an doppelsträngige DNA gebundenes SYBR Green I resultiert ein DNA-Fluoreszenzkomplex, der blaues Licht bei einer Wellenlänge $\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}$ absorbiert und grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$ emittiert. Die entstehende Fluoreszenz durch Amplifikation der DNA in der Probe wird in der Glaskapillare kanalisiert und konzentriert an der Spitze der Kapillare zur Messoptik abgeleitet. Während jedem Zyklus der PCR nimmt das Detektionssystem des LightCycler® das Fluoreszenzsignal auf, daher die Bezeichnung *realtime*-PCR. Gleichzeitig wird das Signal auf dem Bildschirm visualisiert, dieser Vorgang stellt die *online*-Komponente dar.

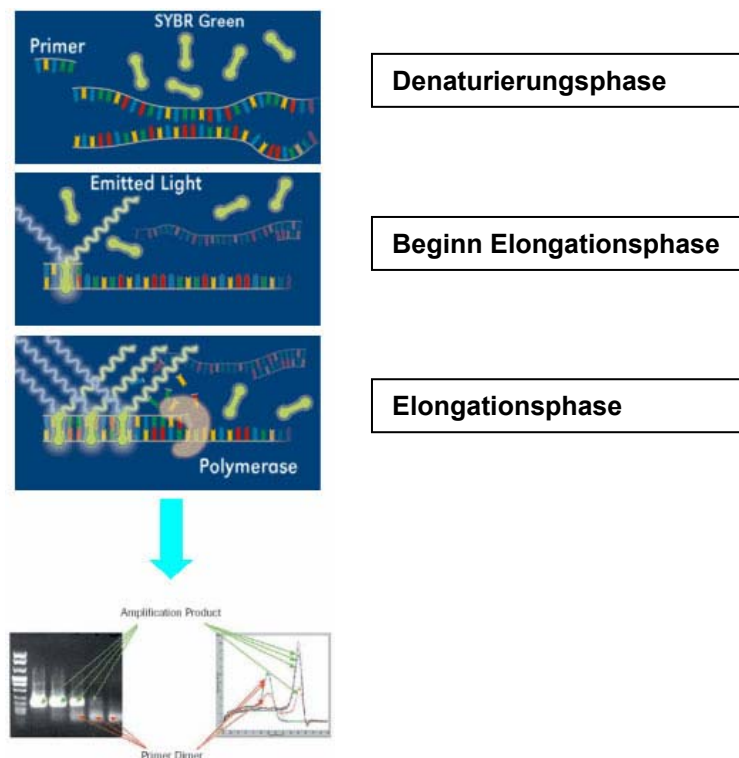


Abb. 6: PCR mit Einlagerung SYBR Green I.

(<http://www.blossombio.com.tw/Images/Service/Quantitative%20PCR/1.jpg>).

Eine PCR hat nur wenige Zyklen, in denen sich das Produkt logarithmisch vermehrt, ehe die PCR-Effizienz abnimmt und schließlich gegen Null geht. Um eine möglichst exakte Quantifizierung zu erzielen, identifiziert der LightCycler®

die Zyklen, in denen sich die PCR in der sog. log-linearen Phase befindet, d.h. in der sich das Produkt in jedem Zyklus verdoppelt. Zur Quantifizierung muss zusätzlich zu den Proben eine Verdünnungsreihe als Standard mitlaufen (s. Abb. 7). Dabei werden Proben und Standard simultan amplifiziert.

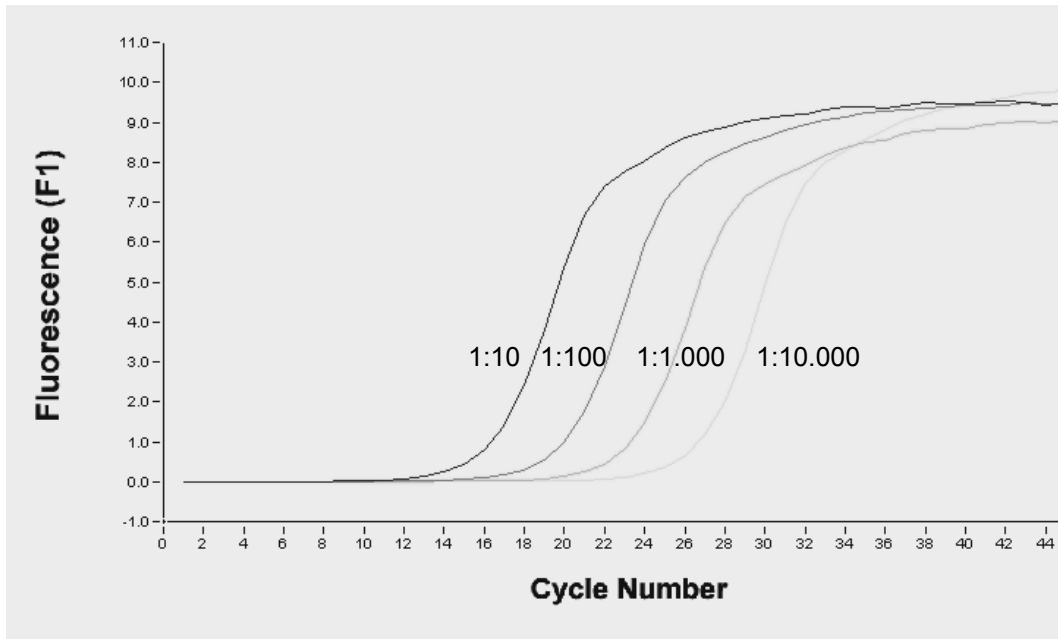


Abb. 7: Verdünnungsreihe. Eine *badA*-Probe wurde bei jedem LightCycler®-Lauf 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 verdünnt. Über diese Verdünnungsreihe wurden relative Amplifikatzahlen der einzelnen Proben durch die LightCycler®-Software ermittelt.

Die Quantifizierung der RT-PCR-Produkte basiert auf Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes (*Threshold Cycle*, C_T -Wert). Dabei handelt es sich um den PCR-Zyklus, bei dem die eingelagerte SYBR Green Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Aus den C_T -Werten und zugehöriger Zykluszahl ermittelt die LightCycler® Software eine Standardgerade, bei der die Zykluszahlen gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen werden (s. Abb. 8). Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe und der unbekanntenen Proben werden ermittelt, indem die Schnittpunkte, d.h. die Zykluszahlen der Proben mit denen des Standards verglichen werden.

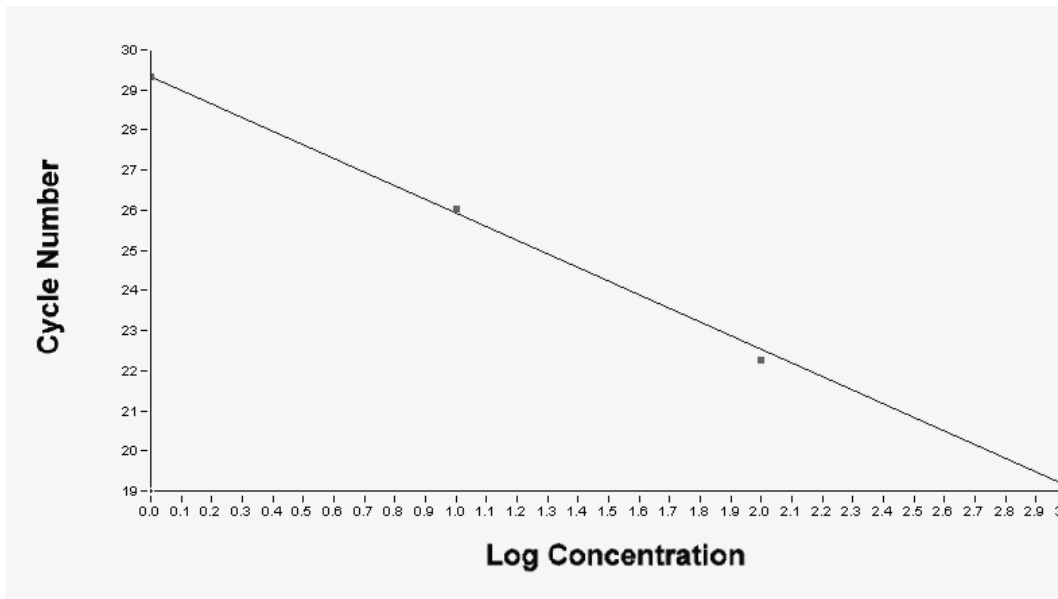


Abb. 8: Standardgerade. Die Standardgerade wird aus den C_T -Werten der Verdünnungsreihe durch die Software des LightCyclers® ermittelt.

Am Ende der PCR kann das LightCycler® System mittels Schmelzkurvenanalyse Aussagen über die amplifizierte Produkte machen (s. Abb. 9). Dabei werden die entstandenen Produkte zunächst bei 95 °C denaturiert und bei 60 °C hybridisiert. Schließlich werden sie in kleinen Intervallen erneut auf 95 °C erhitzt und bei jedem Temperaturintervall die Fluoreszenz gemessen. Sobald die DNA denaturiert ist, wird der Farbstoff freigesetzt und das Fluoreszenzsignal nimmt ab. Die Schmelzkurve des ursprünglichen Genomabschnitts wird visualisiert, indem die erste negative Ableitung dieser Schmelzkurve ($-dF/dT$) berechnet wird. Daraus erhält man einen Graph, dessen Wendepunkt durch einen Peak dargestellt wird, der dem maximalen Schmelzpunkt entspricht. Nun hat jedes doppelsträngige DNA-Produkt seinen eigenen Schmelzpunkt, definiert als die Temperatur, bei der 50 % der DNA in einzelsträngiger und 50 % in doppelsträngiger Form vorliegt. Bestimmend für den Schmelzpunkt einzelner Fragmente sind deren Länge und deren Gehalt an Guanin- bzw. Cytosintriphosphat.

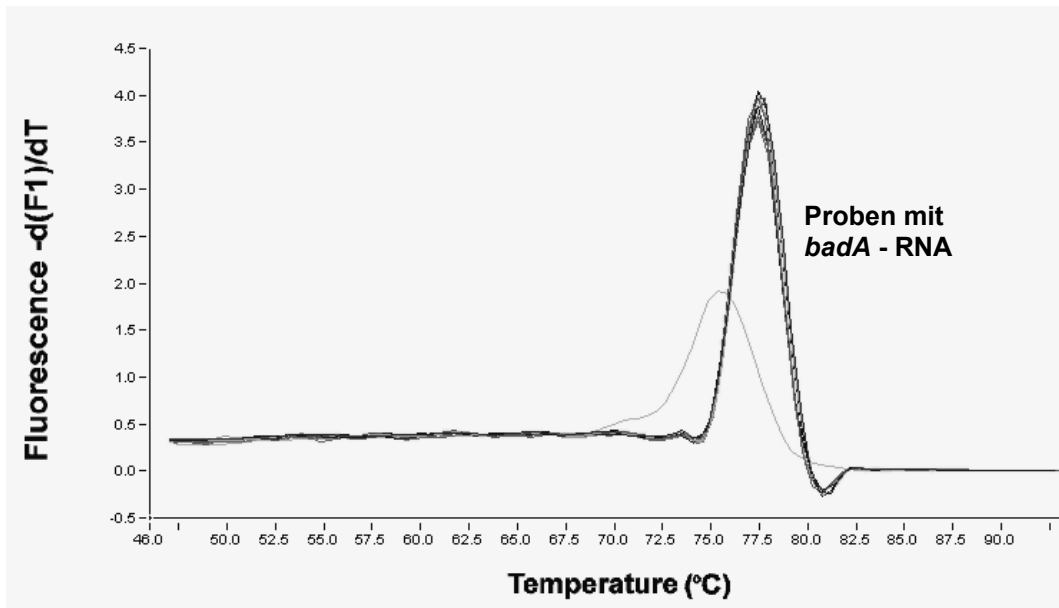


Abb. 9: Schmelzkurve LC. Die Schmelzkurve stellt Fluoreszenz der Proben bei unterschiedlichen Temperaturen dar. Der Peak wird bei der Temperatur erreicht, der die DNA denaturiert. Gleicher Denaturierungspunkt aller Proben schließt Kontaminationen aus. Somit stellt die Schmelzkurvenanalyse eine Qualitätsprüfung der Probe dar.

2.2.4.4 MicrobEnrich-Kit

Um nach Infektionsexperimenten bakterielle von eukaryontischer RNA zu trennen, wurde der MicrobEnrich-Kit verwendet (s. Abb. 10). Schneider-Zellen und Endothelzellen wurden mit *B. henselae* infiziert. Die Kulturen wurden nach 6 h, 4 d und 5 d Inkubation homogenisiert. Um vor Anwendung des Kits schon möglichst wenig intakte Zellen zu haben, wurden die Co-Kulturen zunächst osmotisch mittels Ampuwa und anschließend mechanisch durch Kanülen (27 Gauge) lysiert. Die Lysate wurden für 5 min bei 3.500 rpm abzentrifugiert. Durch den Zentrifugationsgradienten konnte in diesem Schritt schon viel eukaryontisches Material, das sich im Überstand befand, entfernt werden. Das Pellet wurde in 1 ml Trizol suspendiert und die Gesamt-RNA (prokaryontische und eukaryontische) wurde isoliert.

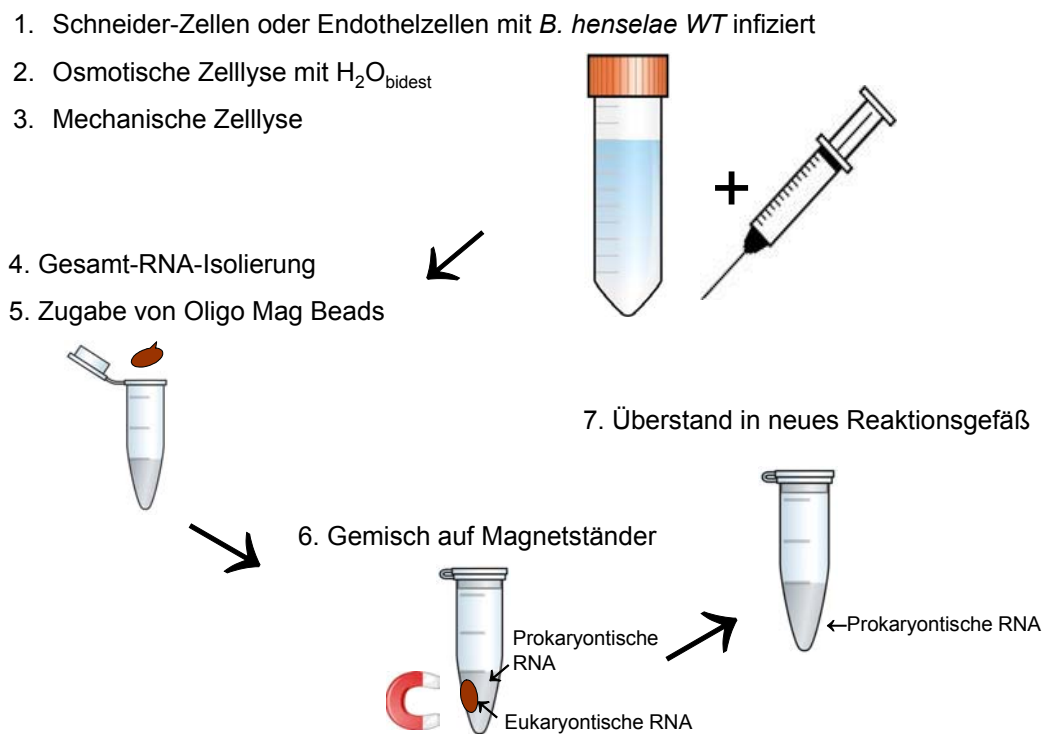


Abb. 10: Methode MicrobEnrich. Darstellung der einzelnen Schritte zur Auftrennung von prokaryontischer und eukaryontischer RNA einer Co-Kultur (Beispielsweise mit *B. henselae* infizierte Endothelzellen) mittels magnetischer Matrix.

25 µg Gesamt-RNA wurden in einem Volumen von 30 µl für den Kit eingesetzt. 300 µl Binding Buffer und pro 5 µg eingesetzter RNA 2 µl Capture Oligo Mix (10 µl) wurden zugefügt. Das Gemisch wurde für 10 min bei 70 °C und anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert. Während dieser einstündigen Inkubation wurden die Oligo Mag Beads aufbereitet. Zum Einsatz kamen pro 5 µg eingesetzter RNA 25 µl (125 µl), die in ein Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert wurden. Das Reaktionsgefäß wurde für gut 3 min auf einem Magnetständer inkubiert. Die Magnetbeads sammelten sich am magnetischen Ständer und der Überstand, der das Lösungsmittel der magnetischen Beads darstellt, konnte abgenommen werden. Nun wurden die Beads gewaschen, zunächst mit *Nuclease-free-water*, anschließend mit Binding Buffer (jeweils im Ausgangsvolumen 125 µl). Bis zum Einsatz wurden die Magnetbeads auf Eis gestellt.

Die mit Capture Oligo Mix versetzte RNA wurde nach einstündiger Inkubation bei 37 °C auf RT abgekühlt und zu den Oligo Mag Beads transferiert. Der Mix wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. Während dieser Inkubation verbinden sich die Magnetbeads mit der eukaryontischen RNA. Grundlage dieses Schrittes ist die Hybridisierung von Oligonukleotiden, die an magnetischen Beads gekoppelt sind, mit dem aufgespalteten Poly-AAA 3'-Ende der eukaryontischen RNA. Nach den 15 min wurde das Reaktionsgefäß auf einen Magnetständer gestellt und die Magnetbeads mit anhängender eukaryontischer RNA zum Magneten hingezogen. Der Überstand, der nun die prokaryontische RNA enthält, wurde in ein *Collection Tube* transferiert und auf Eis gestellt. Die Magnetbeads wurden mit 100 µl *washsolution* gewaschen und der Überstand ebenfalls in das *Collection Tube* pipettiert. Das Volumen der nun prokaryontischen RNA lag zwischen 400-470 µl, nun wurden der Reihe nach 1/10 Volumen (40-47 µl) 3M Sodium Acetate, 4 µl Glykogen und 2,5-faches Volumen eiskalten 100 %-igen Ethanol zugegeben. Anstelle von Ethanol wurde auch Isopropanol im Verhältnis 1:1 zum Fällen der RNA verwendet. Mit Ethanol wurde für mind. 1 h bei -20 °C gefällt, mit Isopropanol für 15 min bei RT. Nach Zentrifugation bei ≥ 10.000 g für 30 min wurde das RNA-Pellet 2x mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und 5 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 15 µl Natrium-Citrat aufgenommen für 10 min auf 55 °C erhitzt und anschließend gevortext. Der DNase-Verdau erfolgte mit 4 µl MgCl₂, 0,8 µl DNase und 0,4 µl RNAsin. Nach 30 minütiger Inkubation wurde die Reaktion mit 2,4 µl DNase-Inaktivator beendet.

Für die LightCycler®-PCR wurde die RNA unverdünnt verwendet.

1x Mastermix:

H ₂ O	4,2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	0,5 µl
SYRmix	2,0 µl
Enzym	0,2 µl
RNA (unverdünnt)	1,0 µl

2.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Bei Agarose handelt es sich um ein Polysaccharid aus D-Galaktose und 3,6 Anhydrogalaktose. In dieser Arbeit wurde Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von DNA verwendet. Die Konzentration der Agarose im Puffer richtet sich nach der Größe der in der Elektrophorese aufzutrennenden Fragmente. Für kleine Stücke eignen sich höherprozentige Gele, für große eher niedrigprozentige Gele. 2,4 g Agarose wurden in 80 ml TAE aufgekocht (= 3 %-iges Gel) und 8 µl Ethidiumbromid als Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben. Die leicht abgekühlte Masse wurde in einen Schlitten transferiert und 15 min getrocknet. Die Proben (10 µl) wurden jeweils mit 3 µl *blue juice* versetzt und aufgetragen. Als Marker dienten 5 µl 50 bp ladder. Das Gel lief schließlich bei 120-130 Volt für ca. 1 h.

2.2.4.6 Northern-Gelelektrophorese

Ein Northern gel wird zum Nachweis von RNA eingesetzt. In dieser Arbeit wurde zur Herstellung eines solchen Gels 0,8 g Agarose mit 68 ml Ampuwa in einer Mikrowelle geschmolzen. Nach Homogenisierung wurden 8 ml 10x MOPS dazugegeben. Nachdem das Gemisch abgekühlt war, wurden 4 ml Formaldehyd hinzu pipettiert. Zum Aushärten wurde das Gel in einen bereits mit Kämmen ausgestatteten Schlitten gegossen. Zwischenzeitlich wurde der Probenpuffer aus 750 µl Formamid, 150 µl 10x MOPS, 262 µl Formaldehyd und 5 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl) angesetzt.

Die Proben enthielten 2 µg RNA in einem Volumen von 4 µl. Hinzu kam das dreifache Volumen (12 µl) Probenpuffer (s.o.). Zusammen wurde das Gemisch 15 min bei 65 °C inkubiert. Vor dem Auftragen kam jeweils 1/6 des Probenpuffervolumens (2 µl) an *blue juice* dazu. Bei 65 Volt lief das Gel ca. 2-3 h und wurde zur Dokumentation fotografiert (s. Abb. 11).

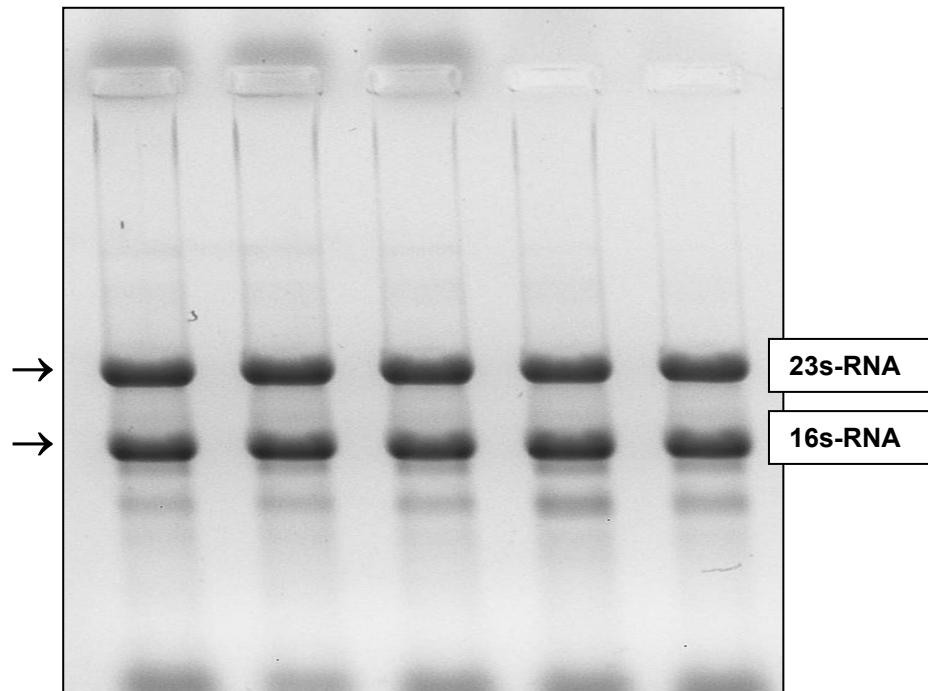


Abb. 11: Northern gel. Darstellung der 23s-RNA und 16s-RNA Banden nach Auftrennung durch Northern-Gelelektrophorese.

Neben der photometrischen Messung zur quantitativen RNA-Bestimmung dient das Northern gel durch die Visualisierung gleichmäßig starker Banden als Kontrolle für richtige Messungen und sauberes Pipettieren.

2.2.5 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Es wurde jeweils eine Versuchsgruppe mit einer Kontrollgruppe verglichen. Alle in den PCR-Analysen ermittelten Werte sind relative und keine absoluten Werte.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von *Bartonella Adhäsins A (BadA)*

In vorausgehenden Beobachtungen wurde festgestellt, dass vielfach passagierte *B. henselae* die Expression des Trimeren Autotransporter Adhäsins BadA einstellen (10,70). Mögliche genetische Ursachen, die dieses Phänomen erklären, sind allerdings unbekannt. Eventuell beeinflussen bestimmte Umweltbedingungen die Transkription des Gens *badA* und somit die Expression des Oberflächenproteins BadA. So wurden in dieser Arbeit in Anlehnung an das Vorkommen von *B. henselae* in Arthropoden und Säugern Umweltbedingungen gewählt, die den physiologischen Bedingungen in diesen Individuen ähneln.

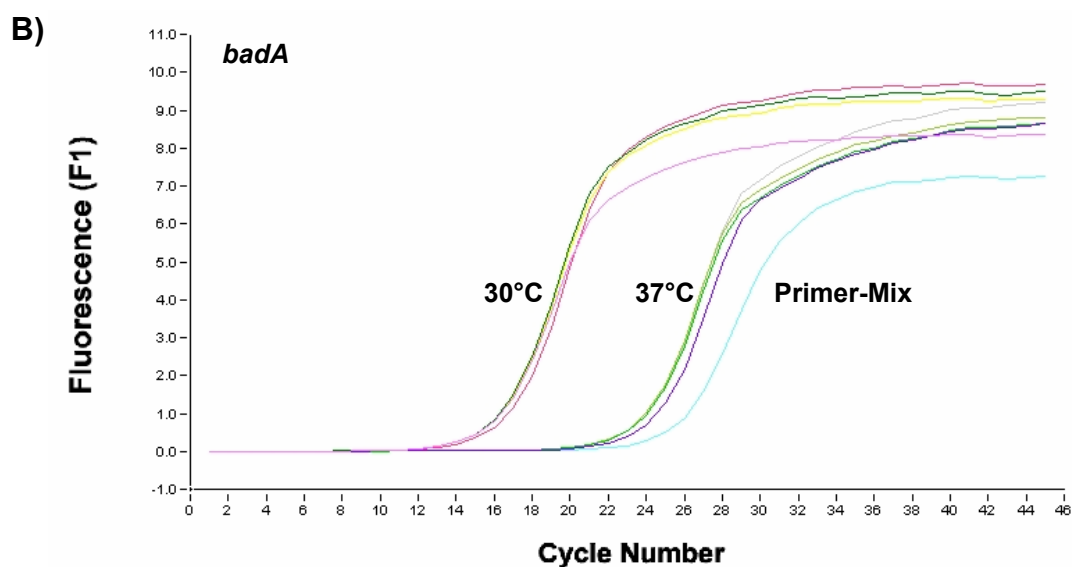
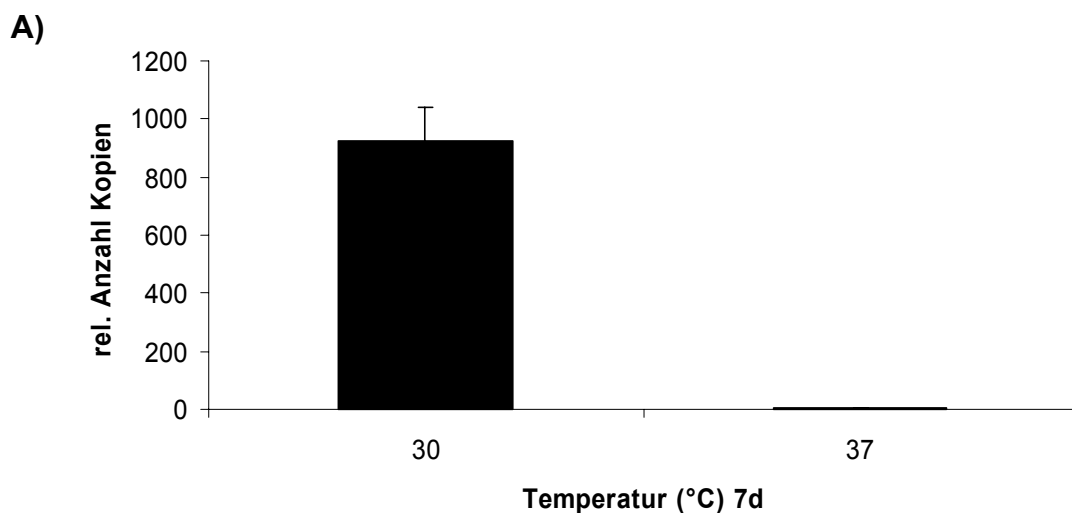
3.1.1 Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die *badA*-Transkription

B. henselae wird von der Katze auf den Menschen übertragen, dies geschieht entweder direkt durch Kratz- und Bissverletzungen oder indirekt über Katzenflöhe (26,27). Während der Sommermonate gibt es prinzipiell mehr Flöhe als im Winter, da sommerliche Temperaturen und eine hohe Luftfeuchtigkeit für die Entwicklung der Katzenflöhe eine wichtige Rolle spielen. Optimale Konditionen für ihr Wachstum sind Temperaturen von 27-30 °C und eine relative Luftfeuchte von 75-92 % (115).

Erste Versuche zur temperaturabhängigen *badA*-Expression wurden folglich zunächst bei 27 °C und 37 °C durchgeführt. Bei 27 °C war das Wachstum von *B. henselae* auf CBA sehr schlecht, darum wurden *B. henselae* bei 30 °C kultiviert. 37 °C entsprechen der menschlichen Körpertemperatur und sind zugleich optimal für das Wachstum von *B. henselae*. Zusätzlich wurde auch eine Temperatur von 42 °C in die Versuchsreihe hinzugenommen. Hierbei zeigte sich jedoch kein Unterschied zu den Ergebnissen, die bei 37 °C erhalten wurden. Daher wurde die Bedingung 42 °C nicht weiter untersucht (Daten nicht gezeigt).

B. henselae gleicher Passagenummer wurde zum gleichen Zeitpunkt für 7 d bei 30 °C oder 37 °C, bei 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die prokaryontische RNA isoliert und die *badA*-Transkription mittels RT-PCR im LightCycler® quantifiziert.

Diese Untersuchungen ergaben, dass es zwischen 37 °C und 42 °C keinen wesentlichen Unterschied in der *badA*-Transkription gab. Daraufhin wurden die weiteren Experimente auf die Temperaturen 30 °C und 37 °C beschränkt. Erste Ergebnisse zeigten eine 30-fache bis 180-fache (s. Abb. 12 A) Hochregulation der *badA*-Genexpression bei 30 °C gegenüber 37 °C nach 7 d Inkubation. Auf Proteinebene war ein schwacher quantitativer Unterschied der BadA-Expression mittels Western Blot und IFT ebenfalls nachweisbar (s. Abb. 12 C, D).



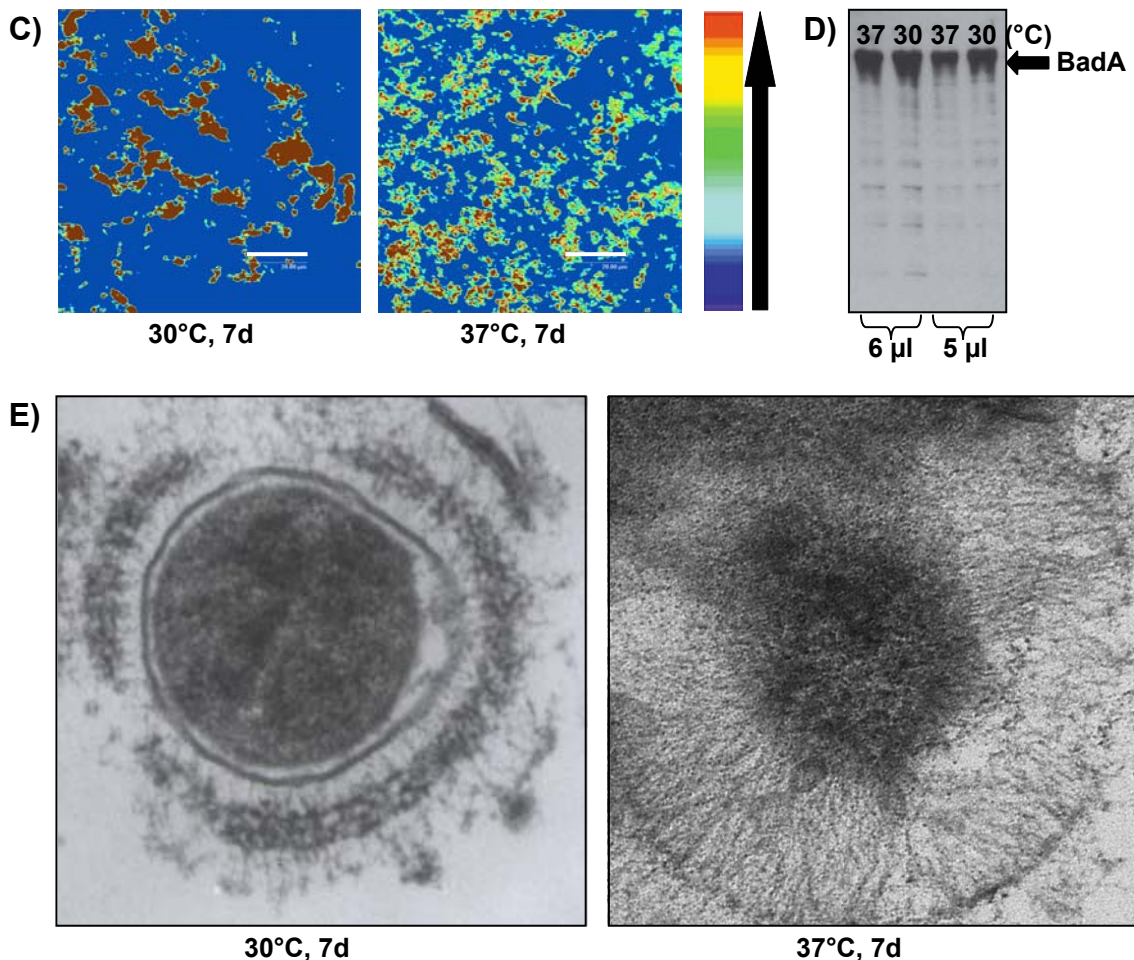


Abb. 12: Temperatureinfluss auf die Expression von *badA*. **A:** Bestimmung der relativen Amplifikanzzahl von *badA* bei 30 °C und 37 °C nach sieben Tagen Bakterienkultur (Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 4 Werten). **B:** *badA* Amplifikate: RT-PCR; LightCycler®-Darstellung (30 °C und 37 °C Inkubationstemperatur). **C:** Analyse der BadA Proteinexpression nach Immunfluoreszenzfärbung am konfokalen Laserscanningmikroskop („*glow-mode*“); rot: starke BadA-Expression, grün: schwache BadA-Expression. Skalierung 20 μm. **D:** Bestimmung der BadA-Expression mittels Western Blot mit α-BadA-Antikörpern. **E:** Elektronenmikroskopische Darstellung von *B. henselae* nach siebentägiger Inkubation bei 30 °C und 37 °C.

Da es sich bei den Ergebnissen der PCR nur um relative Gen-Expressions-Werte handelt, die vom LightCycler®-Programm über eine Verdünnungsreihe einer der 30 °C-Proben errechnet wurden, galt es als nächstes, ein konstitutiv exprimiertes Gen zu finden. Normalerweise wird die RNA-Menge des zu untersuchenden Gens auf ein solches „*housekeeping gene*“ bezogen, um quantitative Analysen durchzuführen. Für *B. henselae* sind aber keine

konstitutiv exprimierten Gene publiziert. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit *gyrA*, *gyrB* (59), die bei anderen Bakterien konstitutiv exprimiert werden sowie *rpsL* (Christoph Dehio, persönliche Mitteilung) als Kontrolle eingesetzt. Eine wichtige Rolle im Rahmen der Transkription spielt die Topoisomerase II (Gyrase). Dabei handelt es sich um ein Heterotetramer, das von zwei Untereinheiten A und B aufgebaut wird, die durch *gyrA* und *gyrB* kodiert werden. Gyrase ist ein Enzym, das nur in Bakterien vorkommt, so dass Gyrase-Hemmer in der Antibiotikatherapie Einsatz finden. Gyrase kann DNA-Doppelstränge spalten und das bakterielle Chromosom oder Plasmid in einen energiereichen negativ superspiralisierten Zustand überführen, ein Vorgang, der ATP verbraucht.

Ribosomen erfüllen entscheidende Funktionen während der Proteinbiosynthese und kommen sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten vor. Bakterielle Ribosomen bestehen aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, die entsprechend ihrer Sedimentationskonstanten als 50 S und 30 S bezeichnet werden. Die kleine Untereinheit wird aus einer rRNA-Kette (16 S) und etwa 21 Proteinen aufgebaut, eines davon ist das durch das *rpsL*-Gen kodierte ribosomale Protein S12 (*“ribosomal protein small subunit 12“*) (34).

Die Funktionen von *gyrA* und *gyrB* sowie *rpsL* setzen voraus, dass diese Enzyme unabhängig von exogenen Faktoren ständig gebildet werden und damit ihre Funktion als *„housekeeping gene“* berechtigt ist. Tatsächlich sieht der Kurvenverlauf für *gyrA*, *gyrB* und *rpsL* dem *badA*-Verlauf ähnlich: in Abb. 13 sind die Amplifikationskurven von *gyrB* exemplarisch dargestellt. Deshalb kann vermutet werden, dass es sich bei der zuvor angenommenen temperaturabhängigen Hochregulation des *badA*-Gens um ein Wachstumsphänomen handelt.

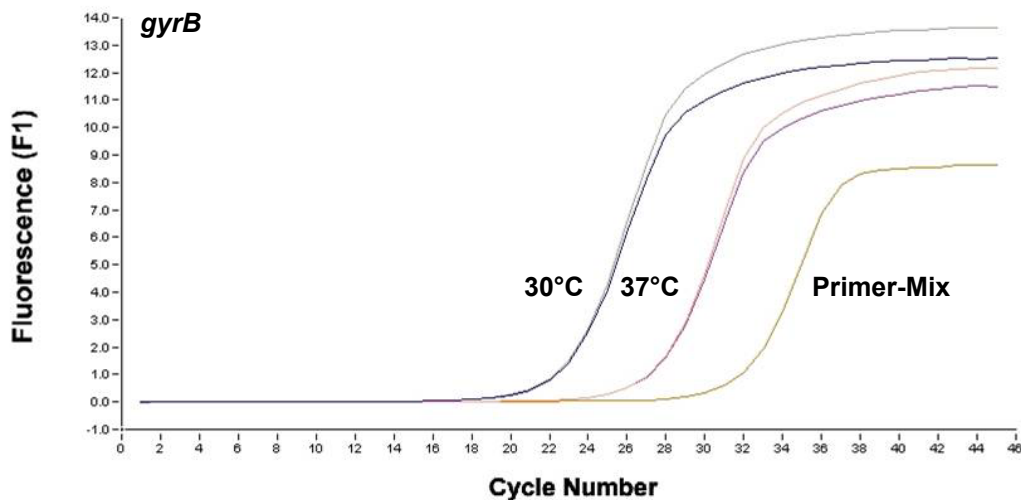


Abb. 13. Temperatureinfluss auf die Expression von *gyrB*. Die isolierte RNA des Versuches aus Abb. 12 wurde im LightCycler® auf *gyrB*-Amplifikate untersucht.

Dieser Hypothese wurde nachgegangen, indem zunächst Bakterien bei 30 °C und 37 °C inkubiert wurden. Nach 3, 5 und 7 Tagen erfolgte die RNA Isolierung und schließlich wurde die Transkription von *badA* untersucht. Makroskopisch wiesen die 37 °C-Kulturen stets einen dichteren Bakterienrasen auf, des Weiteren ließen sich die Bakterien, die bei 30 °C inkubiert wurden, viel leichter vom Agarboden ablösen.

Die LightCycler®-Daten zeigten von Tag 3 zu Tag 5 und nochmals zu Tag 7 eine deutlich geringere Amplifikatanzahl bei den Bakterien, die bei 37 °C kultiviert wurden (Abb. 14, A, C), während die Bakterien bei 30 °C eine nahezu gleiche Amplifikatanzahl über alle drei Zeitpunkte aufwiesen. (Abb. 14, B, C).

Abb. 14: Temperatureinfluss auf die Expression von *badA* zu verschiedenen Zeitpunkten.

Bakterien wurden bei 30 °C und 37 °C für 3, 5 und 7 Tage inkubiert, RNA isoliert und die *badA*-Expression im LightCycler® untersucht. **A:** Kurvenverlauf von *badA*-Amplifikaten der 37 °C-Proben an Tag 3, 5 und 7 im LightCycler®. **B:** Kurvenverlauf von *badA*-Amplifikaten der 30 °C-Proben an Tag 3, 5, und 7 im LightCycler®. **C:** Gegenüberstellung der *badA*-Amplifikatabnahme bei 37 °C und dem konstanten Verlauf bei 30 °C (Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 4 Werten).

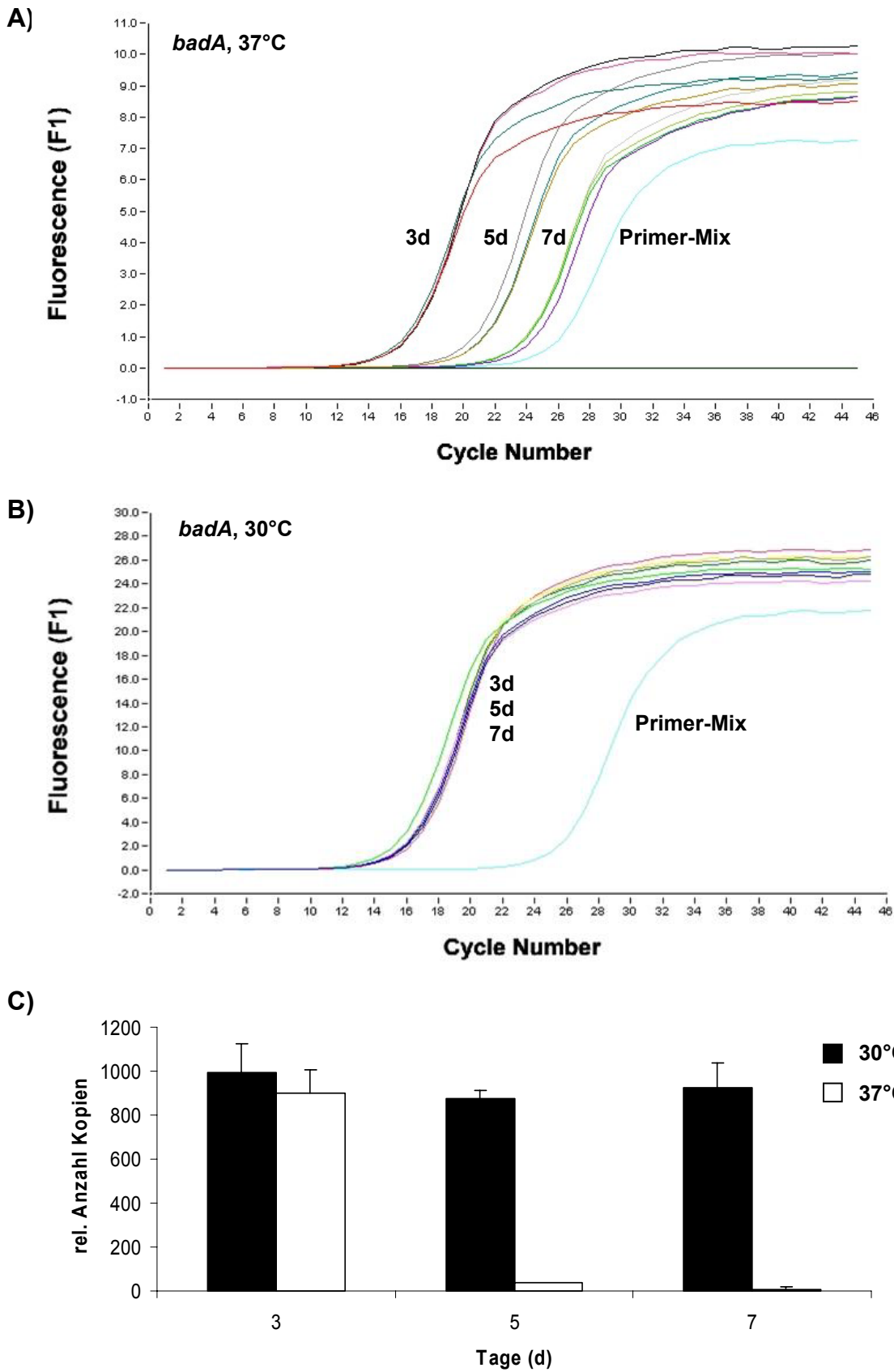


Abb. 14

Die Expression der vermutet konstitutiv expremierten Gene *gyrA*, *gyrB* und *rpsL* wurden ebenfalls nach Inkubationszeiten von 3, 5 und 7 Tagen überprüft und zeigte einen zu *badA* ähnlichen Verlauf (s. Abb. 15).

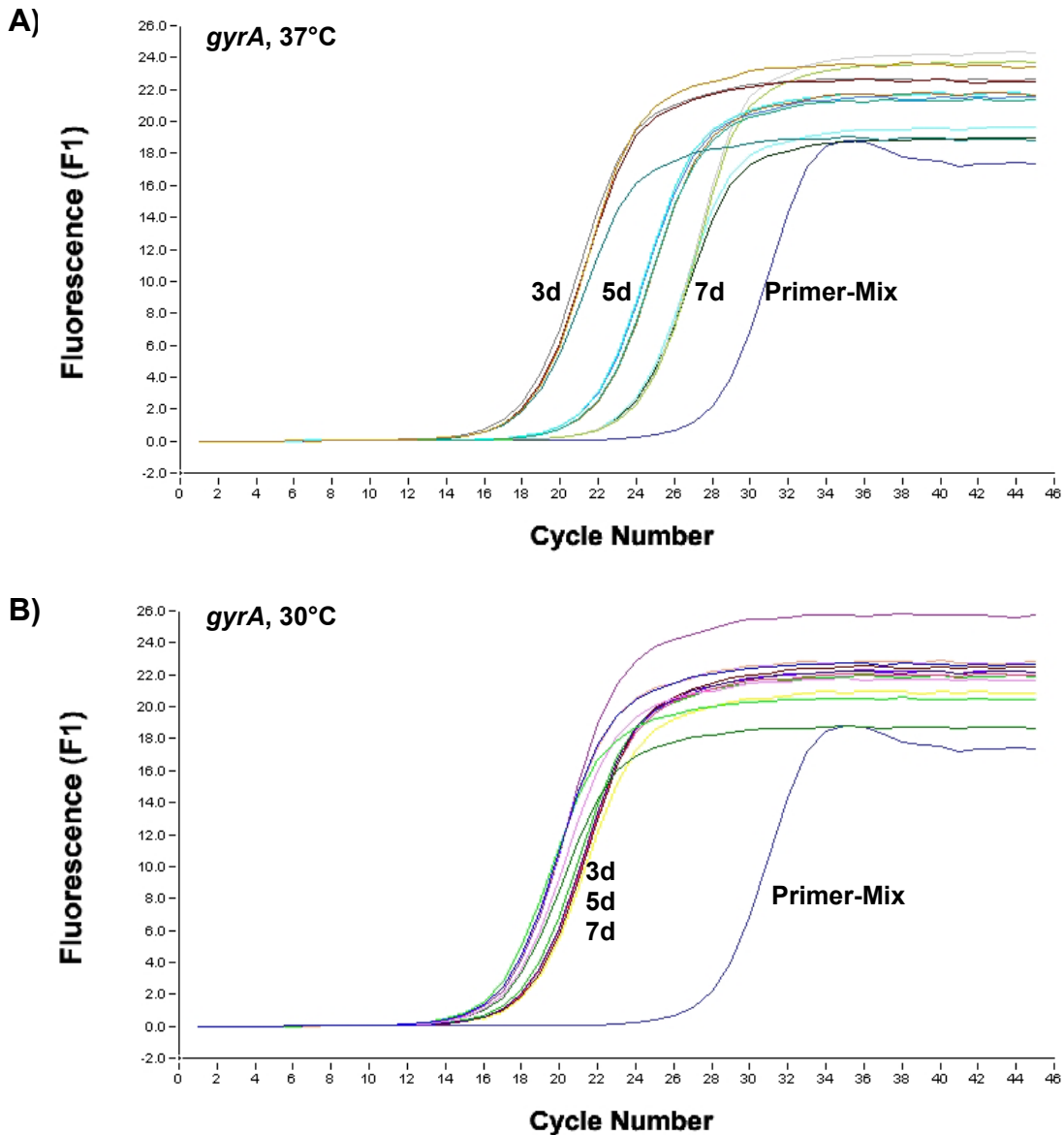


Abb. 15: Temperatureinfluss auf die Expression von *gyrA* zu verschiedenen Zeitpunkten.

Unterschiedliche Inkubationszeiten bei 30 °C und 37 °C. Exemplarisch für alle drei getesteten konstitutiven Gene ist hier die *gyrA*-Transkription dargestellt. **A:** Inkubation bei 37 °C, Abnahme der *gyrA*-Amplifikate mit zunehmender Inkubationsdauer. **B:** Relativ stabile Amplifikatanzahl der 30 °C-Proben über alle drei Zeitpunkte.

Zur weiteren Untersuchung des Umweltfaktors „Temperatur“ wurden die Inkubationslängen verkürzt. *B. henselae* wurde zunächst drei Tage bei 37 °C kultiviert und schließlich ein Teil der Agarplatten über Nacht, für 24 h und für 48 h bei 30 °C kultiviert. Nach den genannten Zeiten wurde RNA isoliert und wiederum die *badA*-Transkription untersucht. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Temperaturen unter diesen kurzen Inkubationslängen in Hinsicht auf die *badA*-Transkription festgestellt werden (s. Abb. 16).

Als Fazit lässt sich aus diesen Versuchen ziehen, dass die *badA*-Expression keiner Temperaturregulation, sondern einem wachstumsunabhängigen Phänomen unterliegt und dass dieses Phänomen auch auf die Untersuchungen sog. „housekeeping“ Gene zutrifft.

Abb. 16: Temperatureinfluss auf die Expression von *badA* in Temperatur-„shift“-Experimenten. In Shift-Versuchen wurde die *badA*-Transkription bei 30 °C und 37 °C mittels RT-PCR im LightCycler® untersucht. **A:** Der Kurvenverlauf zeigt keinen quantitativen Unterschied der Amplifikate bei Inkubation unter den unterschiedlichen Temperaturen über Nacht. **B:** Kein Temperatureinfluss über 24 h. **C:** Kein Temperatureinfluss über 48 h.

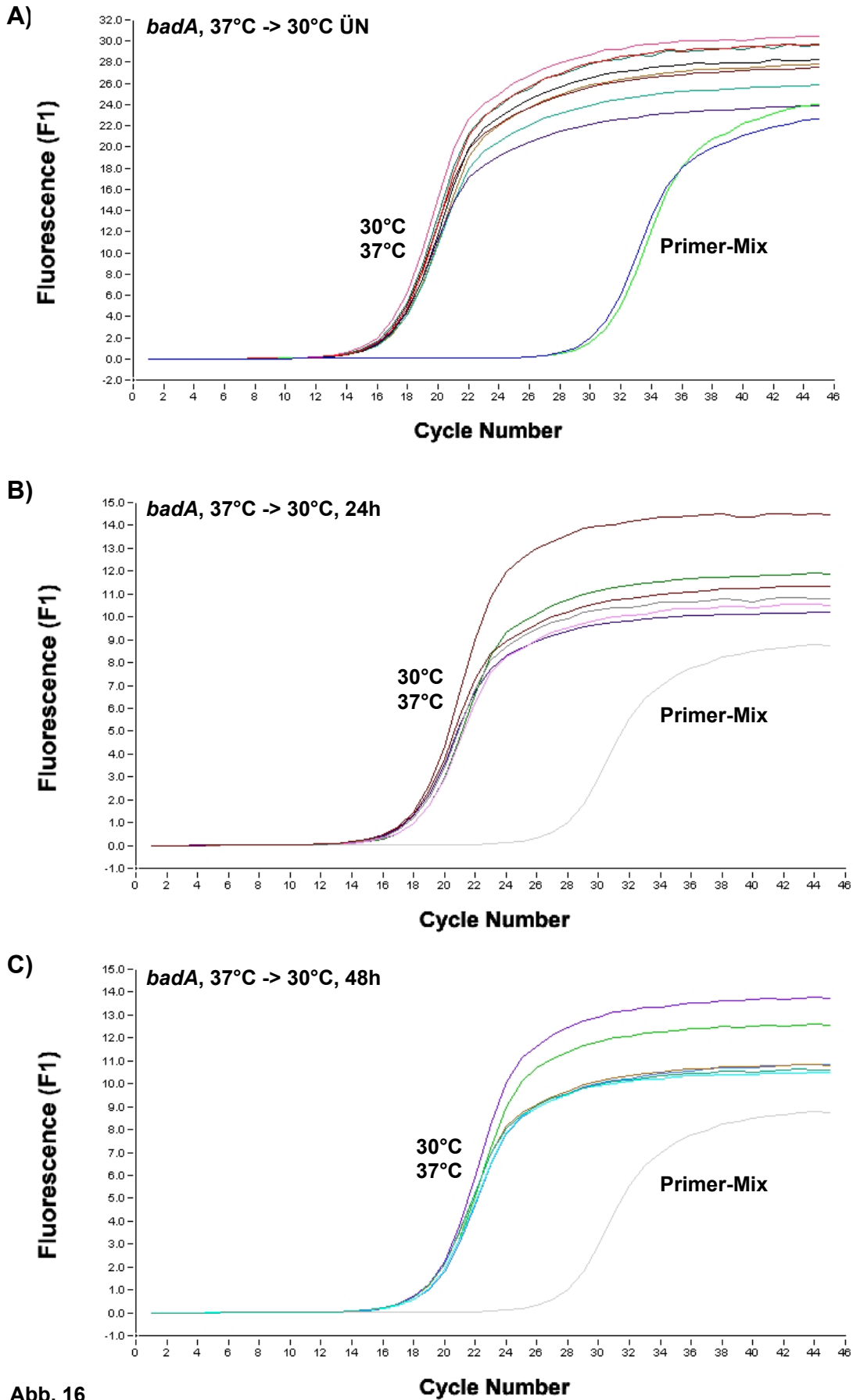


Abb. 16

3.1.2 Einfluss unterschiedlicher DFO-Konzentrationen auf die *badA*-Transkription

DFO ist ein Eisenkomplexbildner. Aus zwei Gründen wurde der Einfluss von DFO auf die *badA*-Transkription untersucht. Zum einen liegt im Katzenfloh eine wesentliche höhere Eisenkonzentration vor als im Menschen und könnte damit ein BadA-regulierender Umweltfaktor sein (11). Zum anderen weisen die vorher beschriebenen Temperaturversuche darauf hin, dass durch das hohe Bakterienwachstum bei 37 °C Nährstoffe der Nährböden schneller aufgebraucht sind, was offensichtlich zu einer Stressreaktion führt, die die Transkription von *badA* drosseln könnte.

Verwendet wurden Agarplatten, auf die unterschiedliche DFO-Mengen aufgespatelt wurden, so dass die Endkonzentrationen bei 2 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM und 25 µM lagen. Darauf wurde *B. henselae* für sieben Tage bei 30 °C oder 37 °C inkubiert. Platten mit 20 µM und 25 µM DFO zeigten makroskopisch kein bakterielles Wachstum. Deshalb wurden alle weiteren Versuche nur mit den Konzentrationen 0 µM, 5 µM und 15 µM DFO durchgeführt. Wie die Abb. 17 und Abb. 18 zeigen, ist ein Einfluss der Eisenkonzentration auf die Transkription von *badA* auszuschließen.

Abb. 17: Einfluss unterschiedlicher DFO-Konzentrationen bei Inkubation (30 °C) auf die *badA*-Transkription. *B. henselae* wurden auf Agarböden mit DFO-Konzentrationen von 0 µM, 5 µM und 15 µM ausplattiert und für sieben Tage bei 30 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ bebrütet. **A:** Darstellung der relativen Amplifikatanzahl von *badA* unter den verschiedenen Konzentrations-Triplicates (Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 4 Werten). **B:** Kurvenverlauf der Proben im LightCycler®. **C:** BadA-Expression analysiert nach Immunfluoreszenzfärbung mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie („*glow-mode*“); rot: viel BadA-Expression, grün: wenig BadA-Expression. Skalierung 20 µm.

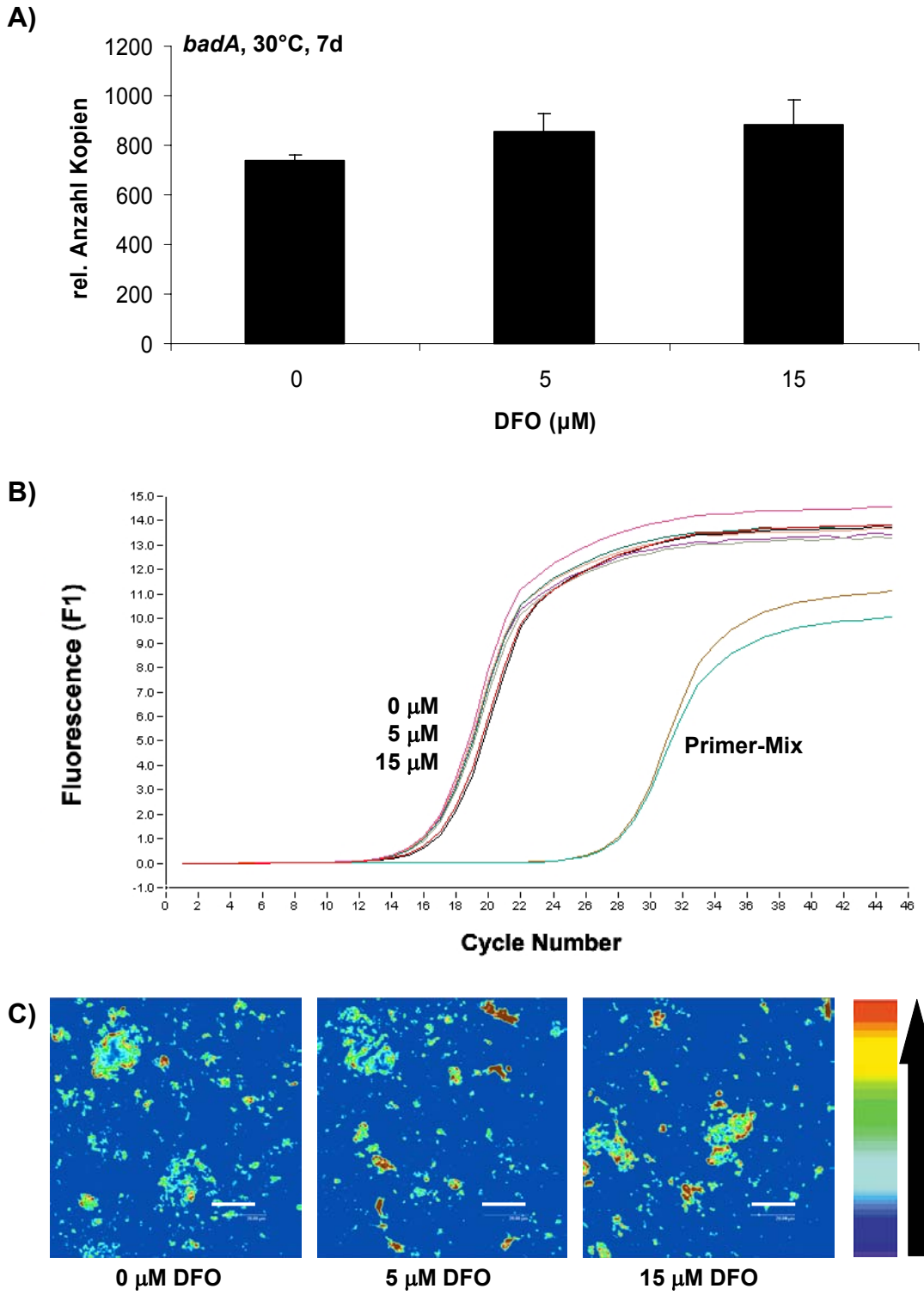


Abb. 17

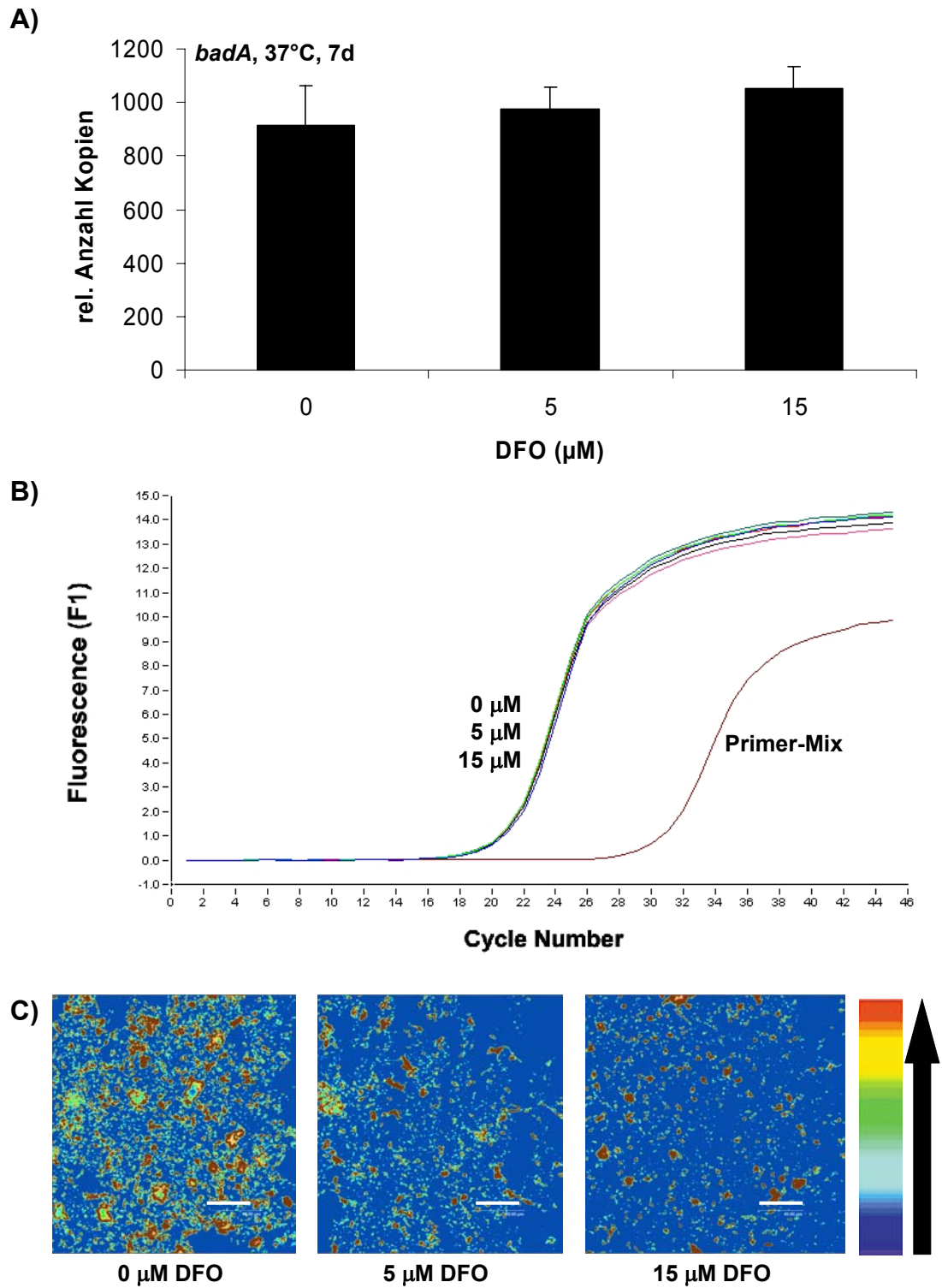


Abb. 18

Abb. 18: Einfluss unterschiedlicher DFO-Konzentrationen bei Inkubation (37 °C) auf die *badA*-Transkription. *B. henselae* wurden auf Agarböden mit DFO-Konzentrationen von 0 μ M, 5 μ M und 15 μ M ausplattiert und für sieben Tage bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ bebrütet. **A:** Darstellung der relativen Amplifikatanzahl von *badA* unter den verschiedenen Konzentrationen (Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 2 Werten). **B:** Kurvenverlauf der Proben im LightCycler®. **C:** BadA-Expression analysiert nach Immunfluoreszenzfärbung mittels konfokalem Laserscanningmikroskop; rot: viel BadA-Expression, grün: wenig BadA-Expression. Skalierung 40 μ m.

Bei den bei 37 °C kultivierten Bakterien ist kein relevanter Unterschied der BadA-Expression zwischen den einzelnen DFO-Konzentrationen zu sehen. Allerdings sind die *crossing-points* (CP) wie auch bei den Temperaturversuchen etwa vier Zyklen später als bei den 30 °C-Proben, was das Ergebnis des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens der Bakterien bei unterschiedlichen Temperaturen stützt.

3.1.3 Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die *badA*-Transkription

Da sich die Sauerstoffkonzentration im Gewebe verschiedener Wirte unterscheiden dürfte, wurde auch diese auf den Einfluss der *badA*-Transkription untersucht. Die Bakterien wurden für sieben Tage bei 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte ebenfalls wieder sowohl bei 30 °C als auch bei 37 °C kultiviert. Die Sauerstoffkonzentration betrug in den hypoxischen Ansätzen 2 %, bei den Kontrollen 21 %. Das Ablösen vom Agarboden war bei den Bakterien unter Hypoxie wesentlich leichter möglich als bei den Proben, die bei atmosphärischem Sauerstoff heranwuchsen.

Der CP der Kontrollproben lag drei Zyklen vor dem der Hypoxieproben (Abb. 19 B). Berechnet auf die relative Amplifikatanzahl zeigt sich damit eine etwa zehnfach höhere *badA*-Transkription unter atmosphärischem Sauerstoff als bei hypoxischen Bedingungen (Abb. 19 A). Der gleiche Versuchsansatz bei 37 °C zeigte ein vergleichbares Ergebnis (Abb. 20 A, B). Auch hier konnte wieder eine Verschiebung des CP in einen späteren Zyklus bei der höheren Temperatur beobachtet werden.

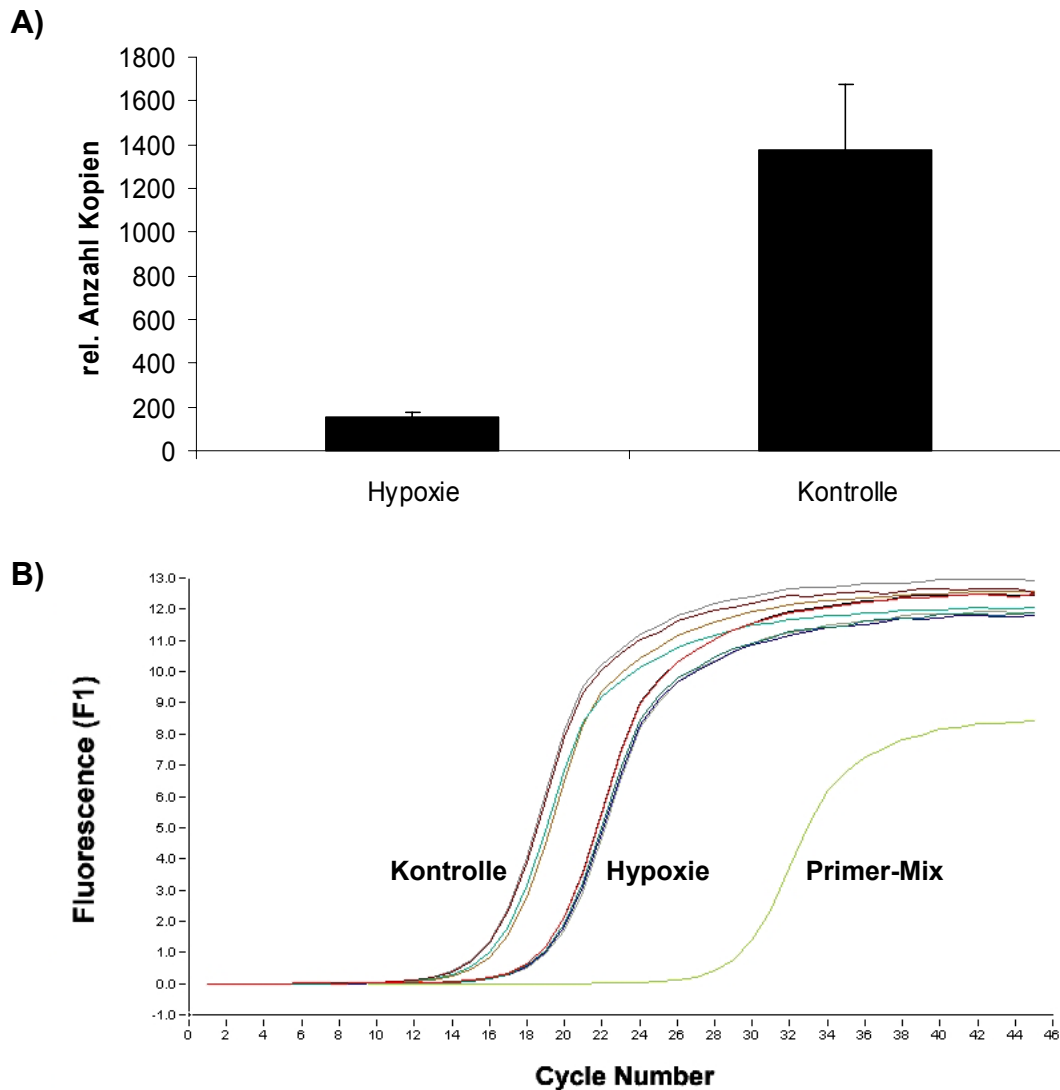


Abb. 19: Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die Transkription von *badA* bei 30 °C nach siebentägiger Inkubation. *B. henselae* wurde für sieben Tage bei 30 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ bebrütet, der Kontrollansatz hatte einen Sauerstoffgehalt von 21 %, der Hypoxieansatz 2 %. **A: Darstellung der relativen Amplifikanzahl von *badA* bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt (Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 4 Werten). **B:** Kurvenverlauf der Amplifikanzahl im LightCycler®.**

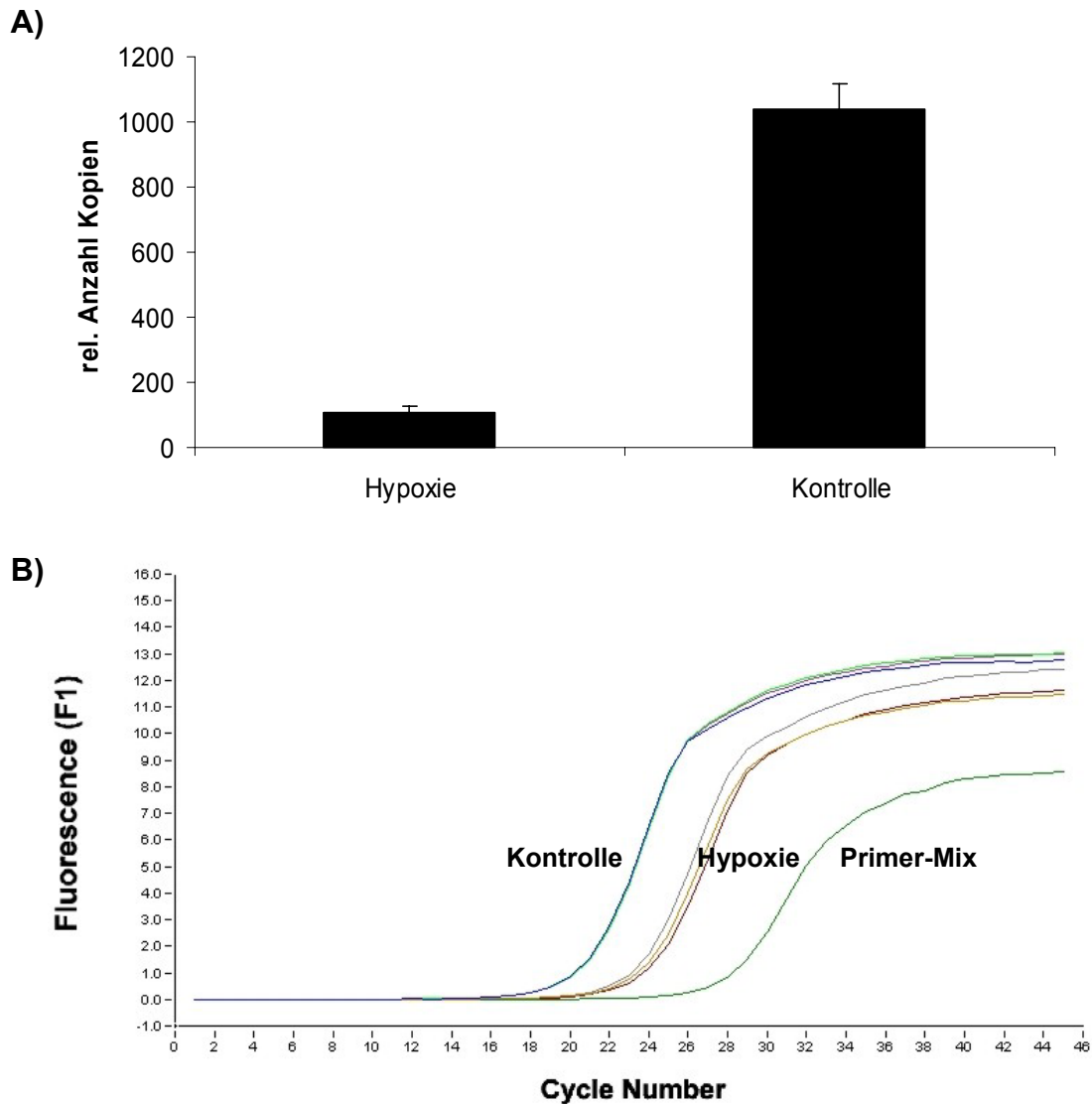
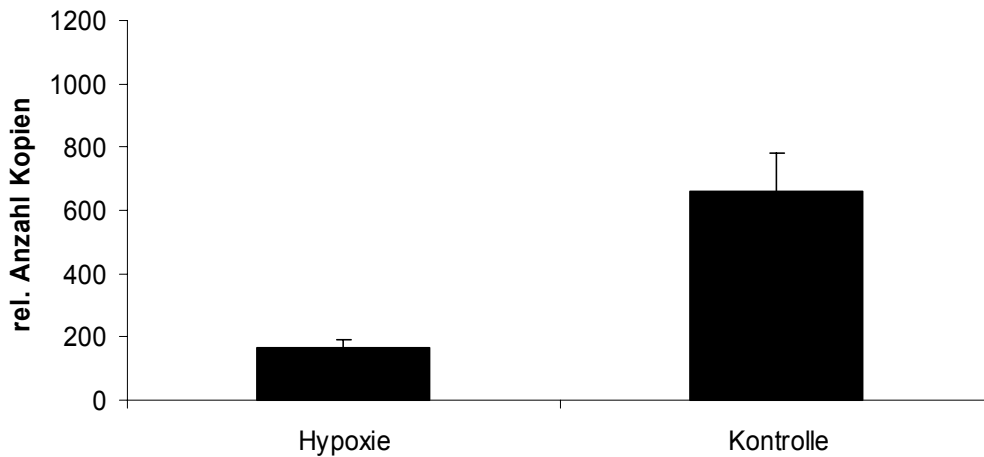


Abb. 20: Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die Transkription von *badA* bei 37 °C nach siebentägiger Inkubation. *B. henselae* wurde für sieben Tage bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ bebrütet, der Kontrollansatz hatte einen Sauerstoffgehalt von 21 %, der Hypoxieansatz 2 %. **A:** Darstellung der relativen Amplifikatanzahl von *badA* bei unterschiedlichem Sauerstoffgehalt (Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 3 Werten). **B:** Kurvenverlauf der Amplifikatanzahl im LightCycler®.

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden unter den genannten Bedingungen neben *badA* auch *gyrA*, *gyrB* und *rpsL* als so genannte „housekeeping genes“ untersucht. Exemplarisch ist in Abb. 21 B und Abb. 22 B die Transkription von *gyrA* bei 30 °C und 37 °C dargestellt. Man kann vermerken, dass der zehnfache Unterschied zwischen den Kontrollproben unter 21 % Sauerstoff und den

Hypoxieproben unter 2 % Sauerstoff den man bei *badA* beobachtet hat, bei *gyrA* 2,4-fach geringer ausfällt (s. Abb. 21 A; Abb. 22 A). Dies lässt vermuten, dass *badA* in der Tat durch Hypoxie reguliert ist.

A)



B)

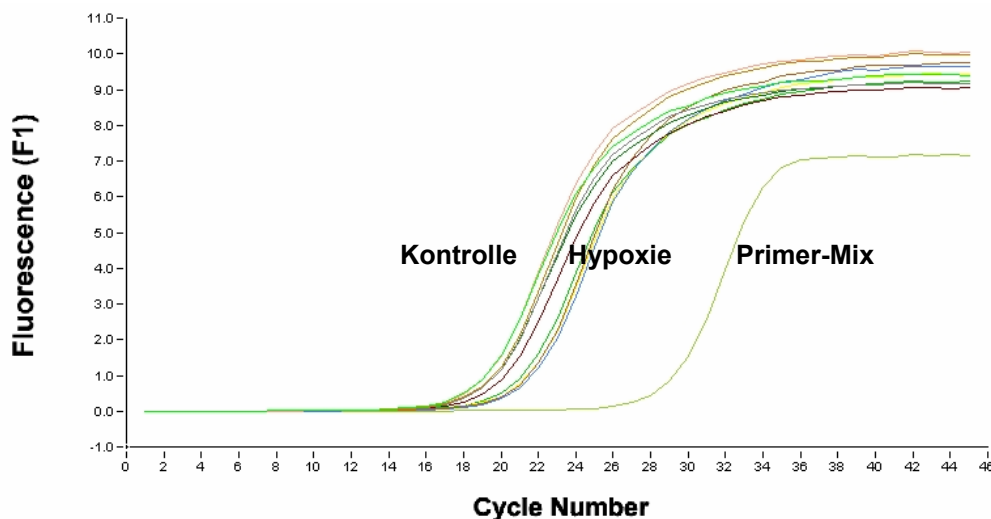


Abb. 21: Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die Transkription von *gyrA* bei 30 °C nach siebentägiger Inkubation. *B. henselae* wurde für sieben Tage bei 30 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und entweder bei 21 % oder 2 % Sauerstoff inkubiert. **A:** Darstellung der unterschiedlichen *gyrA*-Amplifikanzahlen (Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 4 Werten). **B:** Dargestellt ist der Kurvenverlauf der *gyrA*-Amplifikate im LightCycler®. Der Abstand der CP der beiden Ansätze ist kleiner als der, den man bei *badA* beobachtet hat.

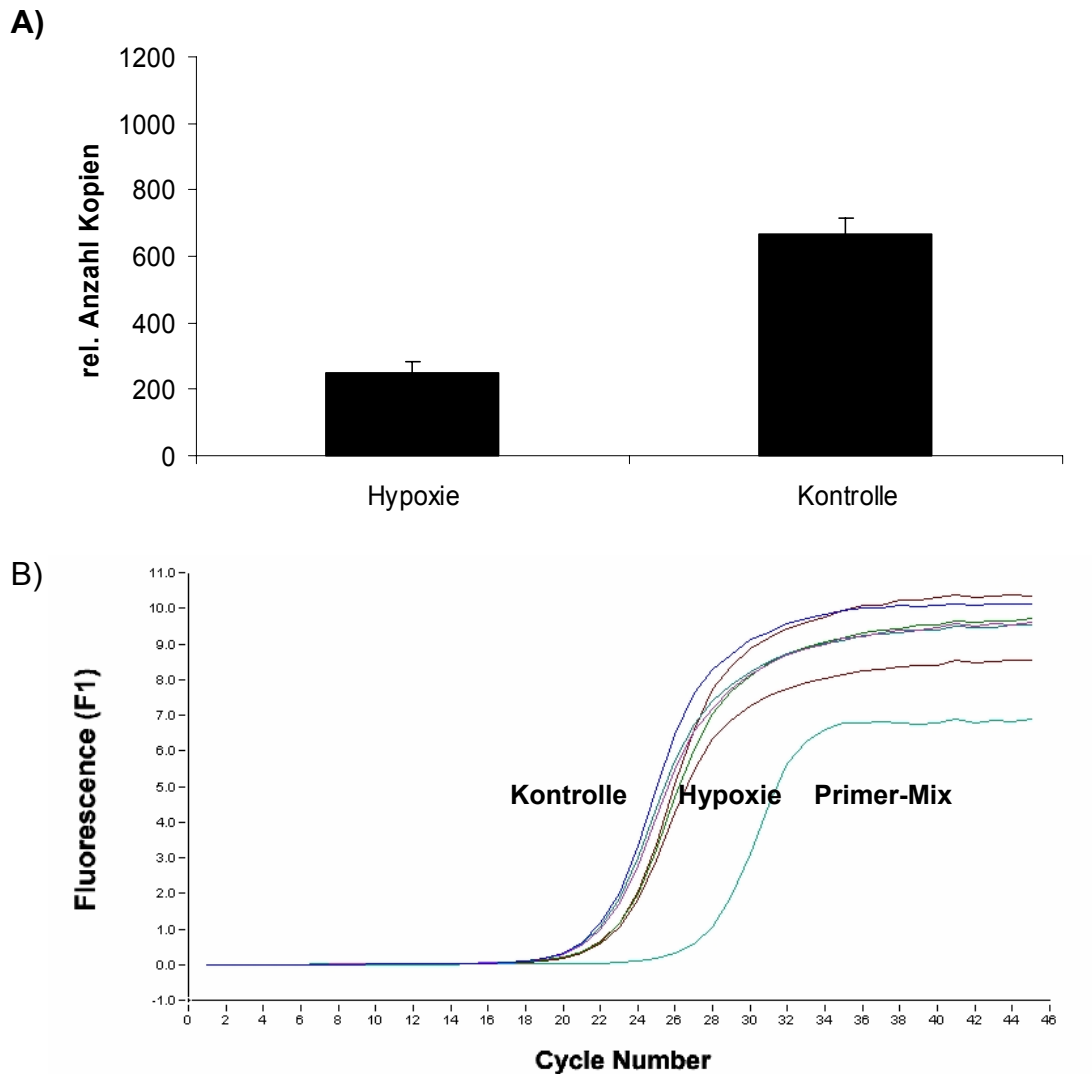


Abb. 22: Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die Transkription von *gyrA* bei 37 °C nach siebentägiger Inkubation. *B. henselae* wurde für sieben Tage bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und entweder bei 21 % oder 2 % Sauerstoff inkubiert. **A:** Darstellung der unterschiedlichen *gyrA*-Amplifikanzahlen (Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 3 Werten). **B:** Dargestellt ist der Kurvenverlauf der *gyrA*-Amplifikate im LightCycler®. Der Abstand der CP der beiden Ansätze ist kleiner als der, den man bei *badA* beobachtet hat.

So findet sich bei Kultivierung bei 30 °C ein 4-facher Unterschied der relativen Amplifikanzahl, bei 37 °C beträgt der Unterschied nur noch 2,6-fach. Diesen Ergebnissen zu Folge besteht ein Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Transkription von *badA*.

3.2 Einfluss zellulärer Interaktion auf die *badA*-Transkription

Bereits bekannt ist, dass *B. henselae* einen Endothelzellotropismus aufweist (119). Es galt herauszufinden, ob die Anwesenheit von Endothelzellen, die die Zielzellen für *B. henselae* im menschlichen Körper darstellen, eine Wirkung auf die Transkription von *badA* hat. Wegen des Vorkommens von *B. henselae* im Katzenfloh wurden neben den menschlichen Endothelzellen Insektenzellen zum Vergleich eingesetzt. Bei den verwendeten Insektenzellen wurden hierzu Schneiderzellen verwendet, die gattungsspezifisch den Flohzellen ähnlicher sind als Endothelzellen. Schneiderzellen sind Epithelzellen des letzten embryonalen Stadiums von *Drosophila melanogaster*, häufig als S₂-Zellen bezeichnet, da die „zweite“ Reihe von 1972 am verbreitetsten ist.

3.2.1 Interaktion von *B. henselae* mit Schneiderzellen

Eine typische Eigenschaft von Schneiderzellen ist, dass sie nach jedem Passagierschritt zunächst zwei Tage am Boden der Kulturflasche adhären, sich im weiteren Verlauf lösen und frei im Medium schwimmen. Infiziert man Schneiderzellen mit *B. henselae* (MOI: 40), sind die Zellen auch noch nach über fünf Tagen am Boden der Zellkulturflasche adhären. IFT-Untersuchungen lieferten Hinweise für Adhärenz von *B. henselae* an Schneider-Zellen und für eine starke Bakterienvermehrung. Die Bakterien lagerten sich in Haufen um die Zellen herum an, allerdings ohne Aussage über die Vitalität der Bakterien (s. Abb. 23). Hingegen wurden Kokulturen täglich ausplattiert und anhand der CFU eine Wachstumskurve erstellt. Dabei zeigte sich eine deutliche Abnahme der lebenden Bakterien bereits zwei Tage nach Infektion.

Zur Untersuchung der *badA*-Expression wurden 5×10^6 Insektenzellen mit *B. henselae* (MOI: 40) infiziert. Nach einer Inkubation von 5 Tagen wurde die Gesamt-RNA dieser Kokultur isoliert. Durch Verwendung des sog. MicrobEnrich-Kit sollte die prokaryontische RNA von der eukaryontischen getrennt werden (s. Kapitel 2). Allerdings gelang es nicht, ausreichend bakterielle RNA zu gewinnen um damit weiter arbeiten zu können. Somit wurden keine Ergebnisse zum Einfluss von Insektenzellen auf die Transkription von *badA* erzielt.

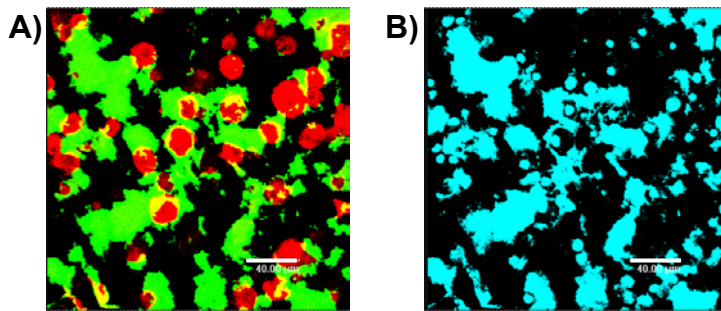


Abb. 23: Immunfluoreszenzfärbung mittels konfokalem Laserscanningmikroskop von mit *B. henselae* infizierte Schneiderzellen. A: grün wurde *B. henselae* durch α -BadA-Antikörper gefärbt, rot wurde das Zytoskelett der Schneiderzellen durch Phalloidin-TRITC gefärbt. **B:** Mittels DAPI-Färbung wurde die DNA der Bakterien und der Zellen zusätzlich dargestellt. Skalierung 40 μ m.

3.2.2 Interaktion von *B. henselae* mit Endothelzellen

Bereits bekannt ist, dass *B. henselae* an Endothelzellen adhärirt und sogar intrazellulär überlebt. Beobachtungen zeigen, dass die Replikation von *B. henselae* in Endothelzellen schneller von statten geht als auf Standardnährböden (69). Die Endothelzellen wurden mit *B. henselae* infiziert (MOI: 260; 750) und 3-6 h inkubiert. Es folgte die Isolierung der Gesamt-RNA und der Einsatz des MicrobEnrich-Kits. Auch hier war es leider nicht möglich, ausreichend bakterielle RNA zu isolieren, um mögliche Einflüsse auf die Transkription von *badA* zu untersuchen.

3.3 Testung von Flüssigmedien

Infektionsexperimente von Schneiderzellen mit *B. henselae* zeigten erhebliches bakterielles Wachstum in mikroskopischen Kontrollen. Dies kann durch unterschiedliche Mechanismen verursacht sein:

- (i) Direkte Interaktion von Schneiderzellen und *B. henselae*.
- (ii) Schneiderzellen geben Substanzen in das Medium ab, die bakterielles Wachstum fördern.
- (iii) Das Insektenmedium selbst könnte Nährstoffe enthalten, die das Wachstum von *B. henselae* erlauben.

Um diese drei Möglichkeiten zu untersuchen, wurde *B. henselae* in vier verschiedenen Ansätzen inkubiert und täglich ausplattiert:

- (1) Schneiderzellen in Insektenmedium.
- (2) Konditioniertes Medium (aus einer Kultur aus Schneiderzellen entnommen). Dieses Medium enthält möglicherweise wachstumsfördernde Substanzen, die von den Schneiderzellen selbst abgegeben werden.
- (3) Frisches Insektenmedium.
- (4) Basales Endothelzellmedium (ohne Antibiotikum, ohne FCS und ohne Supplement).

B. henselae vermehrte sich im frischen Insektenmedium und zeigte den typischen Verlauf der bakteriellen Wachstumskurve (s. Abb. 24: IC frisch). Die CFU stieg vom Ausgangswert $1,0 \times 10^7/\text{ml}$ auf ein Maximum von $1,8 \times 10^8/\text{ml}$ an. In konditioniertem Insektenmedium war ebenfalls Wachstum von *B. henselae* zu beobachten, allerdings nicht so stark wie in frischem Medium. Die Bakterienanzahl stieg von $1,0 \times 10^7/\text{ml}$ auf $1,1 \times 10^8/\text{ml}$ an (s. Abb. 24: IC konditioniert). Die Kokultur Schneiderzellen und *B. henselae* zeigte die ersten drei Tage eine konstante Bakterienanzahl, danach kam es aber zum Absterben, so dass ab Tag vier nach Infektion keine lebenden *B. henselae* mehr vorlagen (s. Abb. 24: IC). Die Kultivierung von *B. henselae* in basalem Endothelzellmedium führte bereits nach einem Tag zum kompletten Absterben aller Bakterien.

Da zum ersten Mal ein Wachstumsverhalten von *B. henselae* in Flüssigmedium nachweisbar war, soll in Zukunft in weiteren Projekten untersucht werden, ob es möglich ist, die Kultivierung von *B. henselae* von Blutagarplatten auf dieses Flüssigmedium umzustellen.

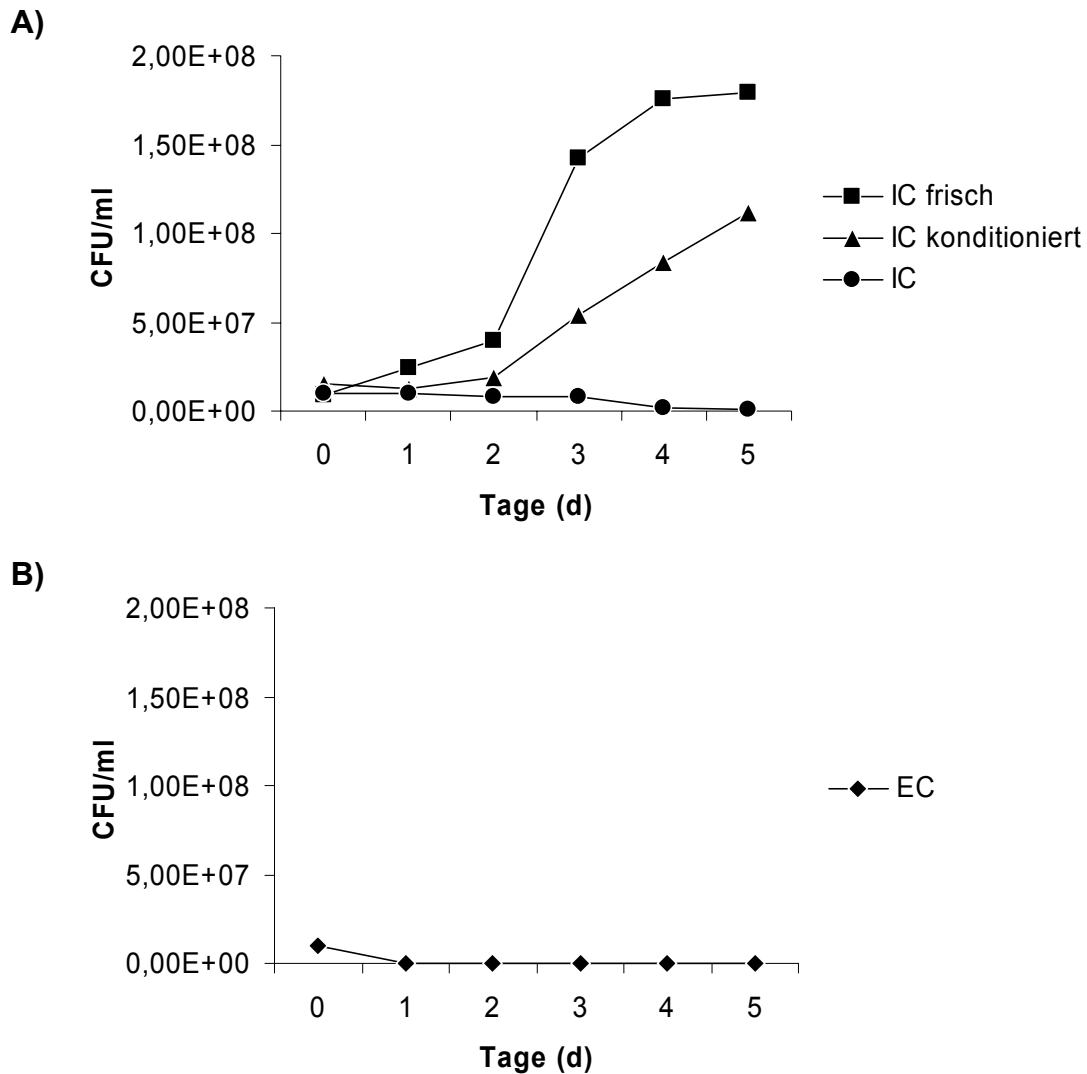


Abb. 24: A): Bakterienwachstum in frischem Insektenmedium (IC frisch), in konditioniertem Insektenmedium (IC konditioniert) und in Kokultur mit Insektenzellen (IC) (jeweils Einfachbestimmungen). **B):** Bakterienwachstum in Kokultur mit Endothelzellen in basalem Endothelzellmedium (EC).

Die Expression von BadA, das für die Bakterien aufgrund seiner Größe einen erheblichen Energieaufwand darstellen dürfte, weist darauf hin, dass das Insektenflüssigmedium eine viel versprechende Alternative zur Bakterienkultur auf Agarplatten ist (s. Abb. 25).

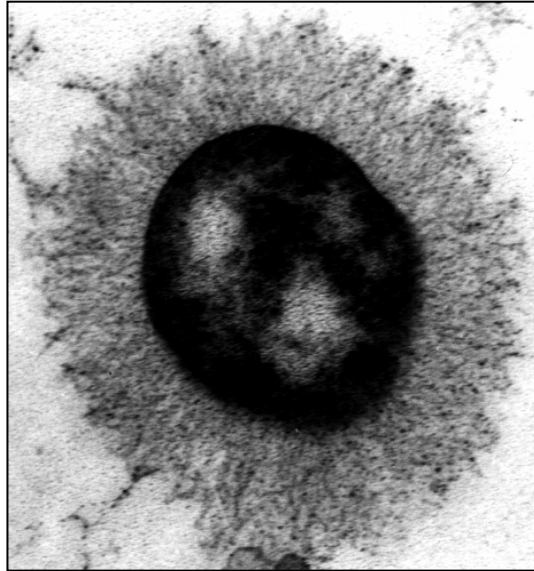


Abb. 25: BadA-Expression von *B. henselae* nach Kultivierung in Flüssigmedium. Auch unter Inkubation in Flüssigmedium exprimiert *B. henselae* massenhaft BadA.

4 Diskussion

Bartonella henselae verursacht die vaskuloproliferativen Krankheitsbilder BA und PH, diese Fähigkeit stellt eine einzigartige Eigenschaft unter humanpathogenen Bakterien dar (6). Grundlage solcher vaskuloproliferativer Prozesse ist eine Interaktion zwischen *B. henselae* und Wirtszellen (z.B. Endothelzellen). Diese sind die vermutlichen Zielzellen des Erregers bei einer Infektion des Menschen. Als grundlegende Mechanismen der Vaskuloproliferation werden zurzeit Hemmung der Endothelzellapoptose (71), Induktion der Endothelzellproliferation (21) sowie Aktivierung einer proangiogenetischen Endothelzellantwort (70) diskutiert.

Die Interaktion zwischen *B. henselae* und Endothelzellen ist wesentlich von der Expression des Oberflächenproteins BadA abhängig. BadA ist ein hochmolekulares (~328 kDa) Protein, das zur Gruppe der trimeren Autotransporter Adhäsine (TAAs) gehört. TAAs sind wichtige Pathogenitätsfaktoren gramnegativer Bakterien und bilden trimere Oberflächenstrukturen mit einer Kopf-Stiel-Anker-Architektur (84).

Vielfaches Passagieren von *B. henselae* führt zum Verlust der BadA-Expression, ein Phänomen, das als Phasenvariation bezeichnet wurde (119). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings unbekannt. Phasenvariation beschreibt ein An- und Abschalten von Genen und könnte in der Tat die Expression von TAAs regulieren. Phasenvariation über Variationen in den TAAA-Nukleotidwiederholungen im *nadA* Promotor wirken sich direkt auf die NadA-Expression aus (92). Phasenvariation einer anderen Art wurde in Form der Anzahl an Guanidin in einem homopolymeren Poly (G)- Bereich stromaufwärts von *uspA1* beschrieben (80). Für *badA* gibt es bislang keinerlei Hinweise auf einen derartigen Regulationsmechanismus (119).

Möglicherweise wird die Expression von TAAs durch Umweltbedingungen reguliert. Unter diese Regulationsbedingungen fallen Änderungen der Temperatur, der Sauerstoffkonzentration oder der Eisenverfügbarkeit. Das bestuntersuchte TAA YadA von *Yersinia enterocolitica* wird beispielsweise über einen temperaturgesteuerten Aktivator namens VirF (LcrF) reguliert (132).

Ebenso konnte für UspA1 von *Moraxella catarrhalis* neben der Phasenvariation eine temperaturabhängige Regulation beschrieben werden (57). Die Expression des NadA von *Neisseria meningitidis* wird u.a. von Fur, einem Eisenaufnahmeregulator, beeinflusst (91).

BadA ist ein sehr großes Protein, dessen Bildung das Bakterium vermutlich viel Energie kostet. Damit wäre es für die Bakterienzelle ökonomisch sinnvoll, BadA nur dann zu exprimieren, wenn es im Infektionsprozess essentiell ist. Diese Phasen, in denen die BadA-Expression sinnvoll wäre, könnten durch Umgebungsbedingungen geregelt werden. So wurden in dieser Arbeit Umweltfaktoren auf ihren Einfluss auf die *badA*-Transkription untersucht. Der Erreger kommt u.a. im Katzenfloh und im Menschen vor. Somit ist es denkbar, dass die unterschiedlichen physiologischen Bedingungen, die in diesen Organismen herrschen, als Regulatoren auf die BadA-Expression wirken. An möglichen Bedingungen kommen Temperatur, Sauerstoffkonzentration und Eisenverfügbarkeit in Frage. Die drei Parameter Temperatur, Sauerstoffkonzentration und Eisenverfügbarkeit wurden dem Katzenfloh und dem Menschen angepasst nachgestellt und die *badA*-Transkription im Folgenden untersucht.

4.1 BadA-Expression im Katzenfloh oder im Menschen?

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie *B. henselae* den Mensch infiziert. Der direkte Übertragungsweg erfolgt durch Kratz- und Bissverletzungen von Katzen, die den natürlichen Reservoirwirt darstellen. Indirekt werden die Keime über Katzenflöhe oder, wie neuere Ergebnisse zeigen, möglicherweise auch durch Zecken übertragen (46).

Im Menschen liegt mit 37 °C eine höhere Temperatur vor als im Katzenfloh, wo ähnlich der Laus ca. 27 °C herrschen (11). Dagegen weist der Floh eine höhere Sauerstoffkonzentration sowie Eisenverfügbarkeit auf (11). Ob einer dieser Faktoren den Bakterien signalisiert, die BadA-Produktion in Gang zu setzen, galt es in dieser Arbeit zu untersuchen. Stellt BadA einen wesentlichen Pathogenitätsfaktor in *B. henselae*-Infektionen dar, müsste eine unterschiedlich starke Expression des TAA zu verschiedenen starken Verläufen des

Krankheitsbildes führen. Die hohe *badA*-Transkription bei einer niedrigen Temperatur könnte dafür sprechen, dass der Prozess im Floh hochreguliert wird. Wenn im Floh mehr *badA* vorhanden ist und *badA* entscheidend für die Infektiosität des Erregers ist, kann man vermuten, dass eine Infektion mit *B. henselae* durch Insekten leichter stattfindet als bei einer direkten Übertragung z.B. von Katzen.

4.1.1 Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die *badA*-Expression

An der Oberfläche von *B. quintana* konnten Häm-bindende Proteine (Hbp) identifiziert werden. Sie weisen keine Homologien zu bekannten bakteriellen Hämrezeptoren auf. Versuche zeigten eine 100-fach höhere Transkription eines dieser Hbps bei 30 °C gegenüber 37 °C (11). Im Falle von *B. quintana* sollte der 30 °C-Ansatz die physiologische Bedingung in der Körperlaus nachbilden, der 37 °C-Ansatz die im menschlichen Körper. Ansonsten ist eine temperaturabhängige Regulation von Pathogenitätsfaktoren von *Bartonella* bereits bekannt (11).

Ähnlich den Ergebnissen von J.M. Battisti mit *B. quintana* konnte in dieser Arbeit nach siebentägiger Inkubation von *B. henselae* bei 30 °C eine 30- bis 180-fach erhöhte Transkription des *badA*-Gens gegenüber Kulturbedingungen bei 37 °C beobachtet werden. Dies könnte für eine Hochregulation im Sinne eines Anschaltens des *badA*-Gens bereits im Vektor Katzenfloh sprechen. Zur Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe einer der im Versuch verwendeten Proben eingesetzt. Dies führte allerdings nur zu relativen Werten der Amplifikanzahlen. Um Absolutzahlen zu erhalten, wurden konstitutiv exprimierte Gene, die unabhängig von Umgebungsfaktoren stets gleich stark aktiv sein sollen, untersucht.

Zum Einsatz kamen *gyrA*, *gyrB* sowie *rpsL*. Die PCR Ergebnisse zeigten allerdings für alle Gene ebenfalls eine höhere Transkription bei 30 °C verglichen mit 37 °C. Dies könnte bedeuten, dass diese Gene bei *B. henselae* nicht konstitutiv exprimiert werden und damit nicht als „housekeeping genes“ bezeichnet werden können. Unsere Daten lassen vermuten, dass die Expression von *badA*, *gyrA*, *gyrB* und *rpsL* abhängig vom Wachstum der

Bakterien sind, da bei 37 °C jeweils besseres Wachstum als bei 30 °C beobachtet wurde.

Genauer untersucht wurde dieser Sachverhalt, indem Kulturen von *B. henselae* bei 30 °C und 37 °C bebrütet wurden, allerdings bereits nach 3, 5 und 7 Tagen die RNA-Isolierung erfolgte. Die Amplifikatanzahl der Bakterien, die bei 30 °C inkubiert wurden, blieb über den gesamten Zeitraum konstant. Die bei 37 °C kultivierten Bakterien, deren RNA an Tag 3 isoliert wurde, zeigten eine den bei 30 °C kultivierten Bakterien vergleichbare Kopienanzahl für BadA. Von Tag 3 zu Tag 5 und nochmals zu Tag 7 kam es aber zu einer deutlichen Abnahme der Amplifikate.

Eine mögliche Erklärung stellt die wachstumsabhängige Genregulierung in *B. henselae* dar. Überimpft man Bakterien in frisches Nährmedium und inkubiert diese bei einer konstanten Temperatur, ändert sich die Bakterienzahl in der gleichen Weise. Bestimmt man in regelmäßigen Zeitabständen die lebenden Bakterien und trägt diese Anzahl logarithmisch auf entsteht i.d.R. eine sog. sigmoide Wachstumskurve (Abb. 26), die in vier Stadien gegliedert wird.

Das erste Stadium ist die lag-Phase (auch Latenzphase). Dabei handelt es sich um einen Zeitraum, in dem die Bakterien mit der Enzyminduktion beginnen um stoffwechselaktiv zu werden. Kolonienwachstum findet in dieser Phase noch nicht statt. Es folgt die log-Phase (auch exponentielle Phase), in der die Vermehrungsgeschwindigkeit ihr Maximum erreicht. In dieser Phase ist die Stoffwechselaktivität konstant, daher findet wahrscheinlich keine Enzyminduktion oder -hemmung statt. Die log-Phase geht in die stationäre Phase über, in der die Vermehrung eingestellt wird. Ursachen dafür sind Nährstofflimitierung oder Akkumulation nicht abbaubarer Metabolite, die eine toxische Wirkung entfalten. Durch diese negativ auf die Bakterien einwirkenden Umgebungsfaktoren kommt es zu einer Drosselung der Stoffwechselaktivität, die mit fortschreitender Zeit völlig eingestellt wird. Die Keime gehen schließlich in der Absterbephase zugrunde (66).

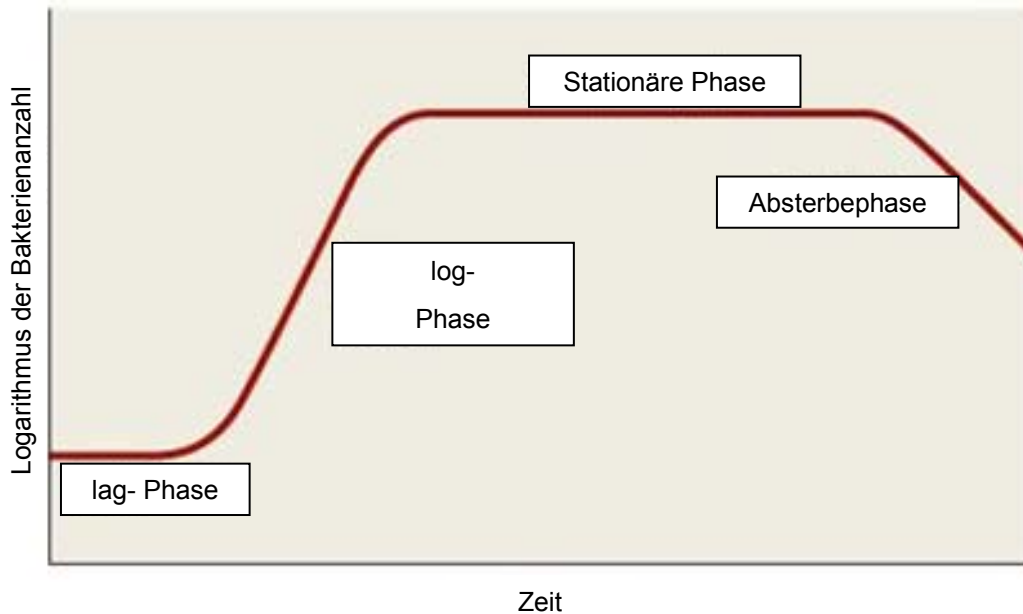


Abb. 26: Bakterielle Wachstumskurve. Bakterien durchlaufen während ihres Koloniewachstums die vier Phasen lag-Phase, log-Phase, stationäre Phase und Absterbephase. Allerdings verweilen unterschiedliche Bakteriengattungen unterschiedlich lang in den einzelnen Phasen, so dass sich für jede Gattung ein spezifischer Verlauf ergibt.

Es kann vermutet werden, dass sich aufgrund des langsameren Wachstums bei 30 °C die Bakterien über die Tage 3, 5 und 7 vermutlich länger in ihrer exponentiellen Phase befanden. Die Stoffwechselaktivität in Form der Transkription von *badA* bliebe hier möglicherweise konstant.

Die bei 37 °C kultivierten Bakterien liegen demnach an Tag 3 ebenfalls noch in der log-Phase vor, da die Aktivität mit einer sehr ähnlichen Anzahl an *badA*-Kopien jener der 30 °C Bakterien entspricht. Es kann vermutet werden, dass allerdings zwischen Tag 3 und Tag 5 bei 37 °C jedoch der Übergang in die stationäre Phase oder sogar in die Absterbephase stattfindet. Im Fall von *B. henselae* findet makroskopisch bei 37 °C im Verlauf von sieben Tagen ein wesentlich stärkeres Koloniewachstum statt, dies führt natürlich auch schneller zu einem Verbrauch der Nährstoffe. Eine Nährstofflimitierung bedeutet für die Bakterien Stress und führt zum Übergang in die stationäre Phase oder Absterbephase. Die noch vorhandene Energie wird zur Bildung lebenswichtiger Enzyme genutzt, zu denen *badA*, *gyrA*, *gyrB* und *rpsL* bei *B. henselae*

möglicherweise nicht gehören. Das makroskopisch unterschiedliche Koloniewachstum bei 30 °C und 37 °C untermauert die These der Temperatureinwirkung auf die Wachstumskurve. Es darf spekuliert werden, dass sich nach ausreichend langer Inkubation bei 30 °C wahrscheinlich eine den 37 °C-Kulturen vergleichbare Bakterienanzahl pro Platte befände. Somit findet man bei 30 °C nur eine relative Induktion, es handelt sich aber eher um ein Artefakt bedingt durch das unterschiedliche Wachstumsverhalten denn um echte Regulation. Die tatsächliche Lösung des Sachverhaltes könnten normierte Wachstumsbedingungen (z.B. in Flüssigmedien) erbringen.

Abgesehen von dem stärkeren Koloniewachstum bei 37 °C war das Ablösen dieser Bakterien vom Agarboden schwieriger. Dieser Befund spricht für vermehrte Autoagglutination bzw. vermehrte Bindung der Bakterien an Fibronektin im Blutagarboden. Bereits gezeigt wurde, dass BadA-Expression und Autoagglutination sowie Fibronektinbindung direkt voneinander abhängen (119). Die PCR-Ergebnisse belegen eine Abnahme der *badA*-Transkription der 37 °C-Bakterien. Dies steht zunächst im Widerspruch zu der makroskopisch festgestellten starken BadA-Expression. Würde BadA nun in der log-Phase transkribiert, translatiert sowie an der Oberfläche exprimiert, dafür in der stationären Phase lediglich exprimiert werden, würde dies die niedrige Transkriptionsphase und makroskopisch den hohen BadA-Besatz der bei 37 °C kultivierten Bakterien erklären.

Eine andere Erklärung dieses scheinbaren Gegensatzes zwischen dem Nachweis des BadA-Proteins und den mRNA-Resultaten ist möglicherweise eine fehlende zeitliche Korrelation von Transkription und Expression des Proteins. So könnte die Produktion bzw. Expression von BadA bei den 37 °C-Bakterien noch in vollem Gange sein, während die Transkription schon herunterreguliert ist. Die bei 30 °C kultivierten Bakterien könnten sich dagegen über Tag 3, 5 und 7 noch in der Transkriptionsphase befinden, die Expression des fertigen Proteins stünde dann noch aus. Nach ausreichend langer Zeit könnte an der Oberfläche quantitativ gleich viel BadA vorhanden sein und die bei 30 °C kultivierten Bakterien würden somit die gleiche

Autoagglutinationsfähigkeit besitzen wie die bei 37 °C kultivierten Bakterien. Transkription und Translation werden von Enzymen gesteuert. Enzyme sind Proteine mit einer spezifischen räumlichen Anordnung. Ist diese Konformation nicht ordnungsgemäß ausgebildet, laufen die zu katalysierenden Stoffwechselprozesse langsamer bis gar nicht ab. Neben anderen Faktoren hat die Temperatur erheblichen Einfluss auf die Konformation und damit auf die Funktionsfähigkeit der Enzyme. Möglicherweise führen Temperaturen von 30 °C zu einer Änderung des aktiven Zentrums, so dass der Prozess Transkription-Translation mehr Zeit benötigt als unter optimalen Bedingungen. Somit würde das BadA der bei 37 °C kultivierten Bakterien bereits an der Oberfläche der Bakterienzelle exprimiert sein, bei den bei 30 °C kultivierten Bakterien jedoch noch nicht. Beispielsweise konnte in *Shigella sonnei* ein ähnlicher temperaturabhängiger posttranskriptionaler Mechanismus entfacht werden (97).

Es gelang nicht sicher, durch Western Blot und IFT unterschiedliche BadA-Proteinmengen der bei 30° C und 37° C kultivierten Erreger darzustellen. Selbst densitrometrische Verfahren lieferten keine klaren Unterschiede der Proteinmengen (Daten nicht gezeigt), so dass kein objektiver Parameter eine verschieden starke BadA-Expression bei unterschiedlichen Temperaturen belegt. Eventuell sind die in dieser Arbeit verwendeten Nachweismethoden für Proteine nicht empfindlich genug, um geringe Expressions-Unterschiede zu zeigen, oder sie sind so empfindlich, dass der Sättigungsbereich bereits erreicht ist. Eine andere Möglichkeit, BadA-Expressions-Level zu überprüfen, könnten indirekte Verfahren (Autoagglutination etc.) darstellen. Bei vergleichbarer BadA-Expression an der Oberfläche sollte die Autoagglutination nicht divergieren. Allerdings wurde eine Diskrepanz im Agglutinationsverhalten nachgewiesen, die auch über mögliche Konformationsänderungen von BadA bei unterschiedlicher Temperatur zu erklären wäre. Wie leicht geringe Temperaturschwankungen die Funktion von Proteinen beeinflussen, zeigen beispielsweise Studien aus der Anästhesie. Unter Narkose kommt es gelegentlich zum Auftreten sog. akzidenteller Hypothermie, mit einer Reduktion der Körperkerntemperatur von 1,5-2,0 °C. Dieser Abfall der Körpertemperatur hat negative Auswirkungen auf

die Immunfunktion und die Blutgerinnung des Patienten (102). Für diese Erscheinungen werden Enzyminhibition durch Temperatur verantwortlich gemacht (143). Auch bei Bakterien könnte dies unterschiedlich starke Autoagglutination und Fibronektinbindung bei gleich starker Expression von BadA erklären. So könnte von *B. henselae* der Funktionsverlust der bei 30 °C kultivierten Bakterien ebenfalls wieder über suboptimale räumliche Anordnung, in diesem Falle des Oberflächenproteins BadA, begründet sein. Temperaturabhängige Konformationsänderungen von Proteinen konnten im Bakterium *Hydrogenobacter thermophilus* gezeigt werden (138).

Um temperaturabhängige Regulationsmechanismen, wie sie für YadA und UspA1 beschrieben sind, auszuschließen, wurden sog. „shift“-Versuche durchgeführt. Dabei wurde *B. henselae* zunächst über 3 d bei 37 °C inkubiert und schließlich ein Teil der beimpften Platten über Nacht, für 24 h sowie für 48 h bei 30 °C weiterkultiviert. In Anbetracht der kürzeren Inkubationszeiten sollte es nicht zu einer Nährstofflimitierung und damit zu einem Einfluss auf die Wachstumskurve kommen. Die Übernachtskulturen sowie Inkubationszeiten von 24 h und 48 h bei 30 °C zeigten keinen Unterschied in der *badA*-Transkription zu den Bakterien, die ausschließlich bei 37 °C kultiviert wurden. Insgesamt kann man davon ausgehen, dass eine niedrige Temperatur (30 °C), wie sie im Katzenfloh zu finden ist oder eine hohe Temperatur (37 °C), die der Temperatur im menschlichen Körper entspricht, die Genaktivität des TAA BadA nicht regulierend beeinflusst.

4.1.2 Einfluss von Eisenmangel auf die *badA*-Expression

Im menschlichen Körper kommt freies Häm nur in kleinen Mengen vor, somit ist die Eisenzufuhr für *B. henselae* Bakterien nach einer Infektion des Menschen limitiert. Im Katzenfloh liegt die Eisenkonzentration dagegen wesentlich höher (11). Interessanterweise wird die Expression von NadA mit Hilfe des Eisenaufnahmeregulators „Fur“ über die Eisenkonzentration des Bakteriums reguliert (91). Um eine Eisenlimitierung *in-vitro* nachzustellen, wurden Columbia-Blutagarplatten mit DFO, einem Eisenkomplexbildner, präpariert. Bei hohen Konzentrationen von 20 µM und 25 µM DFO war das Wachstum der

Bakterienkolonien sehr eingeschränkt. Somit spielt Eisen für das Kolonienwachstum sehr wahrscheinlich eine bedeutende Rolle. Der Einfluss dieser hohen Eisenlimitierung auf *badA* selbst konnte wegen des schlechten Bakterienwachstums unter diesen DFO-Konzentrationen nicht genauer untersucht werden.

Daten zu den DFO-Konzentrationen 0 μM , 5 μM , und 15 μM wurden mittels PCR gesammelt und ausgewertet. Die Bakterien wurden wiederum für sieben Tage bei 30 °C oder 37 °C und den sonst konstanten Bedingungen auf Blutagarplatten mit obigen DFO-Konzentrationen kultiviert. Die *badA*-Amplifikatanzahlen lagen dabei stets im gleichen Bereich, so dass auch unterschiedliche Eisenzufuhr nicht regulatorisch auf die BadA-Expression zu wirken scheint und damit kein Hinweis auf komplexere Regulationsmechanismen (ähnlich dem Fur von *Neisseria meningitidis*) (84) vorliegt.

Da die Ergebnisse der DFO-Versuche keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen zeigten, wurde in diesen Experimenten auf die zusätzliche Untersuchung der ohnehin bei *B. henselae* fraglichen konstitutiven Gene *gyrA*, *gyrB* und *rpsL* verzichtet.

Eine denkbare Fehlerquelle liegt im Aufbringen des DFOs auf die einzelnen Platten. Es ist durchaus möglich, dass einzelne Platten inhomogen mit dem Eisenkomplexbildner DFO versorgt wurden. Extreme Unterschiede der DFO-Konzentration innerhalb einer Platte sollte es aber nicht gegeben haben, da keine Hemmhöfe der Bakterienkultur zu sehen waren.

4.1.3 Einfluss der O₂-Konzentration auf die *badA*-Expression

Es wird angenommen, dass Endothelzellen die Zielzellen einer *B. henselae* Infektion im menschlichen Körper sind. Sie sind für die Angiogenese unerlässlich, durchlaufen dabei nacheinander die Phasen Migration, Proliferation und Differenzierung und kleiden schließlich Gefäße aus (22,48). Die angiogenetische Kaskade läuft an, sobald das Gleichgewicht von Angiogenese-Stimulatoren und –Inhibitoren zugunsten der Stimulatoren verschoben ist („*angiogenic switch*“) (56). Die initialen Auslöser der Angiogenese sind vielfältig. Eine zentrale Position nimmt die Sauerstoffkonzentration ein, sie beeinflusst die Freisetzung proangiogenetischer

Substanzen (24). Wichtigster Vertreter dieser Substanzen ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (120). VEGF führt u.a. zur Proliferation von Endothelzellen, die in die umgebende extrazelluläre Matrix einwandern und schließlich am Ende der angiogenetischen Kaskade ein ausgereiftes Gefäß hervorbringen.

Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren (*hypoxia inducible factors*, HIFs) haben im Prozess der Vaskuloproliferation eine zentrale Rolle (131). Eine Aktivierung des sauerstoffregulierten Transkriptionsfaktor HIF-1 ist bei einer Vielzahl von Erkrankungen, die mit Gewebhypoxie (z.B. ischämische oder neoplastische Erkrankungen) einhergehen nachweisbar (96,146), HIF-1 reguliert die angiogenetisch wirksamen Zytokine VEGF (44,47), ADM (25,72) und IGFBP-3 (113,127). Zurzeit wird davon ausgegangen, dass zelluläre Hypoxie nach einer *B. henselae*-Infektion zu HIF-1 und nachfolgender VEGF-Sekretion führt (67). Sauerstoffreduktion wirkt auf *B. henselae* nicht bakterio-statisch. Da sich die Sauerstoffkonzentrationen im Menschen und im Katzenfloh unterscheiden, sollte der Einfluss von O₂ auf die *badA*-Expression untersucht werden (11).

Der Einfluss der Hypoxie wurde untersucht, indem *B. henselae* bei 2 % Sauerstoff kultiviert wurde (unter sonst für *B. henselae* normalen Kultur-Bedingungen). Simultan wurde zur Kontrolle *B. henselae* bei 21 % Sauerstoff kultiviert.

Unter atmosphärischem Sauerstoff (21 %) war die *badA*-Amplifikatzahl rund zehnfach erhöht (im Vergleich zur Anzahl bei 2 % Sauerstoff). Dieses Ergebnis deutet möglicherweise darauf hin, dass die BadA-Bildung sauerstoffabhängig ist.

Dieser deutliche Unterschied veranlasste uns, diese Versuche mit *gyrA*, *gyrB* sowie *rpsL* als mögliche „*housekeeping genes*“ zu wiederholen. Dabei zeigten diese drei Gene keine so gravierenden Unterschiede der Kopiezahl unter den beiden Bedingungen wie für BadA. Die Proben unter atmosphärischem Sauerstoffgehalt von *gyrA*, *gyrB* und *rpsL* hatten nur noch 2-4fach mehr Amplifikate gegenüber denen unter Hypoxie. Wie schon bei den

Temperaturversuchen betrug die Inkubationszeit dieser Experimente zur Sauerstoffkonzentration sieben Tage. Auch hier könnte diese lange Inkubationszeit wiederum über eine Nährstofflimitierung Einfluss auf die Wachstumsphasen nehmen und ist als Erklärung für die unterschiedlichen Amplifikatzahlen in Betracht zu ziehen. Allerdings ist genauso gut eine mögliche regulatorische Komponente nicht auszuschließen. Eine weitere Differenzierung zwischen diesen beiden Erklärungsversuchen scheiterte bisher an der technischen Umsetzung. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Keime Hypoxie induzieren und damit einen angioproliferativen Prozess in Gang setzen (67), gleichzeitig aber die *badA*-Transkription reduziert wird.

Dies stellt zunächst ein Paradoxon dar: *B. henselae* induziert Hypoxie und schaltet gleichzeitig seinen wichtigsten Pathogenitätsfaktor (BadA) aus. Allerdings ist es denkbar, dass BadA nach Infektion der Zelle sowie dem Aktivieren der angioproliferativen Maschinerie seine Aufgaben erfüllt hat. Um überflüssigen und unnötigen Energieverbrauch zu drosseln, könnte die Expression von BadA eingestellt werden. Dagegen werden die Gene der Transkription und Translation *gyrA*, *gyrB* und *rpsL* auf Grund ihrer wichtigen Funktion im Zellzyklus vergleichsweise wenig gedrosselt. In der Tat ist bislang über die Expression von BadA im weiteren Infektionsverlauf (z.B. intrazellulär) nichts bekannt.

4.2 Einfluss von Wirtszellen auf die Transkription von *badA*

Durch *in-vitro* Versuche wurde bestätigt, dass *B. henselae* neben Endothelzellen eine Vielzahl unterschiedlicher Wirtszellen zu infizieren vermag. Nachgewiesen wurde neben der Infektion von Endothelzellen (39,69,118) Infektionen von Epithelzellen (10,70) sowie von Monozyten bzw. Makrophagen (68,99,110). Die Fähigkeit, Endothelzellproliferation zu induzieren, wie man sie bei *B. henselae*, *B. quintana* und *B. bacilliformis* beobachten kann, wird als neuartige Pathogenitätsstrategie humanpathogener Bakterien verstanden (32,52,86,101). Nach dieser Hypothese verschafft sich *B. henselae* durch eine Induktion des Wachstums von Endothelzellen ökologische Wachstumsvorteile.

Eine klare BadA-abhängige Induktion der proangiogenetischen Wirtszellantwort in Wirtszellen konnte bereits nachgewiesen werden. Darüber weisen *B. henselae* WT eine stärkere Adhärenz und Invasion gegenüber den BadA-defizienten Bakterienstämmen auf (116). Möglicherweise könnte jedoch an erster Stelle der Kaskade ein Einfluss von Seiten der Wirtszellen auf *B. henselae* beispielsweise in Form einer Aktivierung der BadA-Expression stehen. Aus diesem Grund wurden Endothelzellen mit *B. henselae* infiziert und nachfolgend die *badA*-Transkription mittels PCR analysiert. Hierzu wurde die gesamte RNA der Kokultur isoliert, mit Hilfe des MicrobEnrich-Kits sollte die eukaryontische RNA von der prokaryontischen getrennt werden. Allerdings lag nach diesem Trennungsschritt nie ausreichend prokaryontische RNA vor, um sie weiter zu verarbeiten und schließlich mittels RT-PCR im LightCycler® auswerten zu können. Deshalb bleibt ein möglicher Einfluss der Wirtszellen auf die Expression von BadA von *B. henselae* weiterhin ungeklärt.

Schneider-Zellen wurden als nicht menschliche Zellen in die Versuchsreihe aufgenommen. Verwendet wurde die verbreitete „zweite“ Linie 1972 aus einem der letzten embryonalen Stadien von *Drosophila melanogaster*, daher werden sie häufig als S₂-Zellen bezeichnet. Kultiviert werden S₂-Zellen in Kulturflaschen mit Insektenmedium („Schneider-Medium“). Normalerweise wachsen die Zellen bei Temperaturen um 25 °C. Diese Temperatur ist für das Wachstum von *Bartonella* jedoch zu niedrig. Aus diesem Grund wurden die Insektenzellen für diese Arbeit an 30 °C adaptiert. Beobachtungen zeigten, dass Schneiderzellen ein besseres Wachstumsverhalten aufweisen, wenn sie beim Splitten nicht ausschließlich in frisches, sondern in ein Gemisch aus zu gleichen Teilen konditioniertem und frischem Medium gegeben werden. Ursache für dieses bessere Wachstumsverhalten könnten möglicherweise ausgeschüttete Wachstumsfaktoren sein. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit immer zu gleichen Teilen frisches und konditioniertes Medium beim Splitten der Insektenzellen eingesetzt. Der Wachstumsverlauf gestaltete sich so, dass die Zellen die ersten beiden Tage nach einem Splittvorgang am Boden der Kulturflasche adhärent waren, sich an den folgenden Tagen lösten und

schließlich frei im Medium vorlagen. Diese Adhäsion verlängerte sich unter Infektion mit *B. henselae*. Sogar nach fünftägiger Infektion bestand die Adhäsion am Flaschenboden noch fort. Demnach finden sicherlich Interaktionen zwischen Zellen und Bakterien statt. Zudem zeigte die tägliche mikroskopische Verlaufskontrolle eine deutliche Zunahme der Bakterien. Nach 4-tägiger Infektion mit *B. henselae* wurde die Gesamt-RNA isoliert und weiterverarbeitet. Aber auch dieser Versuch scheiterte nach der Auftrennung in prokaryontische und eukaryontische RNA durch den MicrobEnrich-Kit. Dieser Verarbeitungsschritt führte zu einem hohen Verlust an bakterieller RNA, so dass sie leider nicht zum Fortfahren des Versuches mit abschließender RT-PCR ausreichte.

4.3 Etablierung eines Insektenzellmediums als Wachstumsmedium für *B. henselae*

Flüssigmedien zur Kultivierung von Bakterien sind für nahezu alle Bakterien Standard. Sie erlauben beispielsweise eine exakte Bestimmung der einzelnen bakteriellen Wachstumsphase sowie eine genaue Bestimmung der Bakterienanzahl. Auch die Weiterverarbeitung der Keime gestaltet sich einfach und beansprucht im Vergleich zum Abernten von Festnährmedien weniger Zeit. Beispielsweise kann RNA, die binnen kürzester Zeit zerfällt, aus Flüssigkulturen wesentlich zeitnaher isoliert werden. Bisher erfolgte die Kultivierung von *B. henselae* auf Blutagarplatten mit vergleichsweise langen Inkubationszeiten. Die Infektionsexperimente der Schneiderzellen mit *B. henselae* ließen dagegen auf schnelles Bakterienwachstum schließen. Dieser positive Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *B. henselae* kann viele Ursachen haben. Neben der direkten Interaktion zwischen den Zellen und den Bakterien kann das Wachstum eine Antwort auf stimulierende Substanzen sein, die von den Schneiderzellen sezerniert werden und im konditionierten Medium enthalten sind. Natürlich können aber auch einzelne Bestandteile des Insektenmediums selbst diesen positiven Effekt bedingen. Wie die Ergebnisse zeigten, ist tatsächlich das frische, ungebrauchte Insektenmedium für die rasante Vermehrung der Bakterien verantwortlich.

Für die Kultivierung von *Bartonella* spp. wurden in der Vergangenheit schon mehrfach Flüssigmedien beschrieben. Schwarzmann verwendete beispielsweise ein Medium mit „*Fields solution*“ und Hämin (130). Ebenfalls mit Hämin angereichert ist das von Wong beschriebene auf RPMI-164C basierendes Medium (149). Ricardo Maggi schließlich baute sein BAPGM auf Insektenmedium auf (87). Allerdings konnte außer in BAPGM in unserem und in anderen Laboratorien kein Wachstum von *Bartonella* spp. nachgewiesen werden (R. Maggi, persönliche Mitteilung).

Das von uns verwendete Schneidermedium wurde zwischenzeitlich optimiert, wichtige Bestandteile sind fetales Kälberserum sowie Saccharose. Die Vorteile für den Laboralltag liegen in einer präzisen Überwachung des bakteriellen Wachstums mittels optischer Dichtemessung und damit eine präzise Versuchsdurchführung. Zudem ist das Flüssigmedium kostengünstig und einfach in der Herstellung.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurden mehrere mögliche Regulatoren der *badA*-Transkription untersucht. Noch immer ist nicht geklärt, ob Endothelzellen auf die Transkription von *badA* in *B. henselae* Einfluss nehmen. Hier gilt es nach wie vor eine brauchbare Methode zu etablieren, die eine Analyse der bakteriellen RNA nach Infektion ermöglicht, um die Transkriptionsrate des *badA*-Gens ermitteln zu können. Ein möglicher Ansatz wäre mittels eines GFP-Reporterkonstruktes (*green fluorescent protein*), die Aktivität des *BadA*-Promoters zu messen. Das inzwischen etablierte Flüssigmedium wird zukünftig das unterschiedliche Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Temperaturen präziser untersuchen lassen.

5 Zusammenfassung

Infektionen durch *Bartonella henselae* können beim Menschen die vaskuloproliferativen Krankheitsbilder Bazilläre Angiomatose und Peliosis hepatis hervorrufen. Endothelzellen stellen die wahrscheinlichen Zielzellen einer Infektion mit *B. henselae* im menschlichen Körper dar. Verantwortlich für die Adhärenz der Bakterien an die Wirtszelle sowie für die Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort ist das Trimere Autotransporter Adhäsin BadA. Vielfaches Passagieren von *B. henselae* führt zum Verlust von BadA.

In dieser Arbeit sollte die Regulation der BadA-Expression untersucht werden. Differenten physiologischen Bedingungen wie sie im Katzenfloh und im menschlichen Organismus vorherrschen, wurden als mögliche Regulationsbedingungen untersucht. Dabei handelte es sich um unterschiedliche Kultivierungstemperaturen, unterschiedliche Eisenverfügbarkeit sowie unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen. Außerdem sollte analysiert werden, ob die Gegenwart von Wirtszellen (Endothelzellen, Insektenzellen) auf die BadA-Expression Einfluss nimmt.

Die vorliegende Arbeit lieferte folgende Ergebnisse:

1. Unterschiedliche Temperaturen während der Bakterienkultivierung haben keinen regulatorischen Einfluss auf Transkriptionsprozesse. Allerdings ist das Wachstum bei niedrigen Temperaturen verlangsamt.
2. Zugabe von Eisen-Chelatoren bestimmt nicht die Transkription von *badA*, bei hohen Konzentrationen von DFO ist das Koloniewachstum von *B. henselae* jedoch stark eingeschränkt.
3. Kultiviert man *B. henselae* unter Hypoxie, verringert sich die *badA*-Expression um 90 %. Inwieweit es sich hierbei um tatsächliche Genregulation handelt, muss noch bestätigt werden.

4. Ein Einfluss von Wirtszellen auf die Expression von BadA in *B. henselae* konnte wegen technischen Schwierigkeiten nicht genauer untersucht werden.
5. Frisches Schneidermedium ließ *B. henselae* hervorragend wachsen und stellt ein viel versprechendes Flüssigmedium für die schwierig zu kultivierenden Erreger dar.

Umweltbedingungen, die die BadA-Expression in *B. henselae* regulieren, konnten über die hier verwendete mRNA-Technik leider nicht sicher nachgewiesen werden. Allenfalls könnte Hypoxie einen regulierenden Effekt haben, was zukünftig noch zu klären ist. Das Zufallsergebnis, dass *B. henselae* in Insekten-Zell-Flüssigmedium zu kultivieren ist stellt jedoch eine wesentliche Bereicherung für alle Untersuchungen im Bereich der Regulation von *B. henselae* dar, da ein schnelleres Wachstum und leichteres Verarbeiten der Bakterien somit in Zukunft möglich ist.

6 Tabellen

Tab. 1: Klinische Manifestationen einer <i>B. henselae</i> -Infektion	4
Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide	21
Tab. 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.....	22
Tab. 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme	22
Tab. 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zellen	23

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADM	Adrenomedullin
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrom</i>
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	<i>Bartonella</i>
BA	Bazilläre Angiomatose
BadA	<i>Bartonella</i> Adhäsın A
<i>badA</i>	Gen des <i>Bartonella</i> Adhäsın A
bakt.	bakteriell
bp	Basenpaare
BrpA-C	<i>Bartonella repeat protein</i>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CBA	Columbia-Blutagar
CDC	<i>center for disease control</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
C _T	<i>threshold cycle</i>
d	Tag
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindole-2-HCL
DFO	Desferrioxamin
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid

DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzelle
ECL	<i>enhanced chemo luminescence</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-N,N,N',N'-Tetraacetat
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GyrA	Gyrase A
GyrB	Gyrase B
h	Stunde
IFT	Immunfluoreszenztest
HCL	Chlorwasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dest.}	einfach destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest.}	zweifach destilliertes Wasser
HIF-1	<i>hypoxia inducible factor-1</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HRP	<i>horse-radish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
i.d.R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
IGFBP-3	<i>insulin like growth factor binding protein-3</i>
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzerkrankung
KKK	Katzenkratzkrankheit
kV	Kilovolt
LB	Luria Bertani
LC	LightCycler®
M	Molar

mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(4- Morpholino)propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
OD	Optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i>
p	Plasmid
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
PH	Peliosis hepatis
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RNAse	Ribonuclease
rpm	<i>round per minute</i>
<i>rpsL</i>	<i>ribosomal protein small subunit</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
s.	siehe
S ₂	Schneider
sec	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
s.o./s.u.	siehe oben / siehe unten
sog.	so genannt(e)

spp.	Spezies
TAA	trimeres Autotransporter-Adhäsın
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat
U	Unit
u.a.	unter anderem
U.S.	<i>United States</i>
USA	<i>United States of America</i>
v.a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vomps	<i>variably expressed outer membrane proteins</i>
WT	Wildtyp
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsın A
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm

8 Literaturverzeichnis

1. 1999. Serodiagnosis of Emerging Infectious Diseases: *Bartonella* and *Ehrlichia* Infections (course manual), *In* . **Centers of Disease Control and Prevention**.
2. **Adal, K. A., C. J. Cockerell, and J. Petri-WA.** 1994. Cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and other infections due to *Rochalimaea*. *N. Engl. J. Med.* **330**:1509-1515.
3. **Alexander, B.** 1995. A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52**:354-359.
4. **Amano, Y., J. Rumbea, J. Knobloch, J. Olson, and M. Kron.** 1997. Bartonellosis in Ecuador: serosurvey and current status of cutaneous verrucous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **57**:174-179.
5. **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.
6. **Anderson, B. E. and M. A. Neuman.** 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin. Microbiol Rev* **10**:203-219.
7. **Barton, A. L.** 1909. Descripción de elementos endo-globulares hallados en las enfermos de fiebre verrucosa. *La Crónica Médica de Lima* **26**:7-10.
8. **Bass, J. B., Jr., L. S. Farer, P. C. Hopewell, R. O'Brien, R. F. Jacobs, F. Ruben, D. E. Snider, Jr., and G. Thornton.** 1994. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention. *Am. J Respir. Crit Care Med* **149**:1359-1374.
9. **Bass, J. W., J. M. Vincent, and D. A. Person.** 1997. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **16**:163-179.
10. **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.
11. **Battisti, J. M., K. N. Sappington, L. S. Smitherman, N. L. Parrow, and M. F. Minnick.** 2006. Environmental signals generate a differential and coordinated expression of the heme receptor gene family of *Bartonella quintana*. *Infect Immun.* **74**:3251-3261.

12. **Benson, L. A., S. Kar, G. McLaughlin, and G. M. Ihler.** 1986. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect. Immun.* **54**:347-353.
13. **Berger, T. G. and J. E. Koehler.** 1993. Bacillary angiomatosis. *AIDS Clin. Rev.* 43-60.
14. **Brenner, D. J., D. G. Hollis, C. W. Moss, C. K. English, G. S. Hall, J. Vincent, J. Radosevic, K. A. Birkness, W. F. Bibb, F. D. Quinn, and .** 1991. Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2450-2460.
15. **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.
16. **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.
17. **Brouqui, P., B. LaScola, V. Roux, and D. Raoult.** 1999. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N. Engl. J. Med.* **340**:184-189.
18. **Brouqui, P. and D. Raoult.** 1996. *Bartonella quintana* invades and multiplies within endothelial cells in vitro and in vivo and forms intracellular blebs. *Res. Microbiol* **147**:719-731.
19. **Caniza, M. A., D. L. Granger, K. H. Wilson, M. K. Washington, D. L. Kordick, D. P. Frush, and R. B. Blichington.** 1995. *Bartonella henselae*: etiology of pulmonary nodules in a patient with depressed cell-mediated immunity. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1505-1511.
20. **Carithers, H. A.** 1985. Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. *Am. J. Dis. Child* **139**:1124-1133.
21. **Carley, W. W., A. Szczepanski, and M. E. Gerritsen.** 1996. Cytokeratin expression and hyaluronic acid production in cultures of human synovial microvascular endothelial cells: influence of cytokines and growth factors. *Microcirculation.* **3**:359-370.
22. **Carmeliet, P.** 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* **9**:653-660.
23. **Carmeliet, P.** 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**:932-936.

24. **Carmeliet, P. and R. K. Jain.** 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**:249-257.
25. **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.
26. **Chomel, B. B.** 2000. Cat-scratch disease. *Rev. Sci. Tech.* **19**:136-150.
27. **Chomel, B. B., R. W. Kasten, K. Floyd-Hawkins, B. Chi, K. Yamamoto, J. Roberts-Wilson, A. N. Gurfield, R. C. Abbott, N. C. Pedersen, and J. E. Koehler.** 1996. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1952-1956.
28. **Clarridge, J. E., III, T. J. Raich, D. Pirwani, B. Simon, L. Tsai, M. C. Rodriguez-Barradas, R. Regnery, A. Zollo, D. C. Jones, and C. Rambo.** 1995. Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2107-2113.
29. **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.
30. **Cockerell, C. J. and A. E. Friedman-Kien.** 1988. Epithelioid angiomatosis and cat scratch disease bacillus. *Lancet* **1**:1334-1335.
31. **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.
32. **Conley, T., L. Slater, and K. Hamilton.** 1994. *Rochalimaea* species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro. *J Lab Clin. Med* **124**:521-528.
33. **Cooper, T. G.** 1981. *Biochemische Arbeitsmethoden.* Gryter, Berlin .
34. **Dean, D.** 1981. A plasmid cloning vector for the direct selection of strains carrying recombinant plasmids. *Gene* **15**:99-102.
35. **Debré, R., M. Lamy, M. L. Jammet, L. Costil, and P. Mozziconacci.** 1950. La maladie des griffes du chat. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop.* **66**:76-79.
36. **Dehio, C.** 2001. *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends Microbiol* **9**:279-285.

37. **Dehio, C.** 2003. Recent progress in understanding *Bartonella*-induced vascular proliferation. *Curr. Opin. Microbiol* **6**:61-65.
38. **Dehio, C.** 2004. Molecular and cellular basis of *bartonella* pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:365-390.
39. **Dehio, C., M. Meyer, J. Berger, H. Schwarz, and C. Lanz.** 1997. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci.* **110 (Pt 18)**:2141-2154.
40. **Dolan, M. J., M. T. Wong, R. L. Regnery, J. H. Jorgensen, M. Garcia, J. Peters, and D. Drehner.** 1993. Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. *Ann. Intern. Med.* **118**:331-336.
41. **Dramsi, S. and P. Cossart.** 1998. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**:137-166.
42. **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.
43. **Drancourt, M. and D. Raoult.** 1993. Proposed tests for the routine identification of *Rochalimaea* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**:710-713.
44. **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.
45. **English, C. K., D. J. Wear, A. M. Margileth, C. R. Lissner, and G. P. Walsh.** 1988. Cat-scratch disease. Isolation and culture of the bacterial agent. *JAMA* **259**:1347-1352.
46. **Eskow, E., R. V. Rao, and E. Mordechai.** 2001. Concurrent infection of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* and *Bartonella henselae*: evidence for a novel tick-borne disease complex. *Arch. Neurol.* **58**:1357-1363.
47. **Ferrara, N.** 1999. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **237**:1-30.
48. **Folkman, J.** 1984. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* **51**:601-604.
49. **Folkman, J.** 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* **82**:4-6.

50. **Folkman, J.** 1995. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* **333**:1757-1763.
51. **Folkman, J. and C. Haudenschild.** 1980. Angiogenesis in vitro. *Nature* **288**:551-556.
52. **Garcia, F. U., J. Wojta, K. N. Broadley, J. M. Davidson, and R. L. Hoover.** 1990. *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells in vitro and is angiogenic in vivo. *Am. J. Pathol.* **136**:1125-1135.
53. **Gilmore, R. D., Jr., T. M. Bellville, S. L. Sviat, and M. Frace.** 2005. The *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* immunodominant surface antigen BrpA gene, encoding a 382-kilodalton protein composed of repetitive sequences, is a member of a multigene family conserved among *Bartonella* species. *Infect. Immun.* **73**:3128-3136.
54. **Golden, S. E.** 1993. Hepatosplenic cat-scratch disease associated with elevated anti-*Rochalimaea* antibody titers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **12**:868-871.
55. **Haimerl, M., A. M. Tenter, K. Simon, M. Rommel, J. Hilger, and I. B. Autenrieth.** 1999. Seroprevalence of *Bartonella henselae* in cats in Germany. *J. Med. Microbiol.* **48**:849-856.
56. **Hanahan, D. and J. Folkman.** 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**:353-364.
57. **Heiniger, N., R. Troller, P. S. Meier, and C. Aebi.** 2005. Cold Shock Response of the UspA1 Outer Membrane Adhesin of *Moraxella catarrhalis*. *Infect. Immun.* **73**:8247-8255.
58. **Henderson, I. R., P. Owen, and J. P. Nataro.** 1999. Molecular switches-the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol. Microbiol.* **33**:919-932.
59. **Huband, M. D., M. A. Cohen, M. Zurack, D. L. Hanna, L. A. Skerlos, M. C. Sulavik, G. W. Gibson, J. W. Gage, E. Ellsworth, M. A. Stier, and S. J. Gracheck.** 2007. In vitro and in vivo activities of PD 0305970 and PD 0326448, new bacterial gyrase/topoisomerase inhibitors with potent antibacterial activities versus multidrug-resistant gram-positive and fastidious organism groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1191-1201.
60. **Hultgren, S. J., S. Abraham, M. Caparon, P. Falk, G. J. St, III, and S. Normark.** 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* **73**:887-901.
61. **Ihler, G. M.** 1996. *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. *FEMS Microbiol. Lett.* **144**:1-11.

62. **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.
63. **Jackson, L. A., D. H. Spach, D. A. Kippen, N. K. Sugg, R. L. Regnery, M. H. Sayers, and W. E. Stamm.** 1996. Seroprevalence to *Bartonella quintana* among patients at a community clinic in downtown Seattle. *J. Infect. Dis.* **173**:1023-1026.
64. **Jacomo, V., P. J. Kelly, and D. Raoult.** 2002. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **9**:8-18.
65. **Jameson, P., C. Greene, R. Regnery, M. Dryden, A. Marks, J. Brown, J. Cooper, B. Glaus, and R. Greene.** 1995. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in pet cats throughout regions of North America. *J. Infect. Dis.* **172**:1145-1149.
66. **Kayser F.H., Bienz K.A., and Z. R. M. Eckert J.** 2001. Medizinische Mikrobiologie Verstehen-Lernen-Nachschiagen, *In* .
67. **Kempf, V. A., M. Lebidziejewski, K. Alitalo, J. H. Walzlein, U. Ehehalt, J. Fiebig, S. Huber, B. Schutt, C. A. Sander, S. Muller, G. Grassl, A. S. Yazdi, B. Brehm, and I. B. Autenrieth.** 2005. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation* **111**:1054-1062.
68. **Kempf, V. A., A. Schairer, D. Neumann, G. A. Grassl, K. Lauber, M. Lebidziejewski, M. Schaller, P. Kyme, S. Wesselborg, and I. B. Autenrieth.** 2005. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell Microbiol.* **7**:91-104.
69. **Kempf, V. A., M. Schaller, S. Behrendt, B. Volkmann, M. Aepfelbacher, I. Cakman, and I. B. Autenrieth.** 2000. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cell Microbiol* **2**:431-441.
70. **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.
71. **Kirby, J. E. and D. M. Nekorchuk.** 2002. *Bartonella*-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:4656-4661.

72. **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.
73. **Koehler, J. E., C. A. Glaser, and J. W. Tappero.** 1994. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA* **271**:531-535.
74. **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.
75. **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.
76. **Koehler, J. E., M. A. Sanchez, C. S. Garrido, M. J. Whitfield, F. M. Chen, T. G. Berger, M. C. Rodriguez-Barradas, P. E. LeBoit, and J. W. Tappero.** 1997. Molecular epidemiology of *bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N. Engl. J. Med.* **337**:1876-1883.
77. **Kordick, D. L., K. H. Wilson, D. J. Sexton, T. L. Hadfield, H. A. Berkhoff, and E. B. Breitschwerdt.** 1995. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3245-3251.
78. **Krieg, A. and D. (Steinkopff.** 1961. Grundlagen der Insektenpathologie; Viren- Rickettsien- und Bakterien-Infektionen, *In* .
79. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
80. **Lafontaine, E. R., N. J. Wagner, and E. J. Hansen.** 2001. Expression of the *Moraxella catarrhalis* UspA1 protein undergoes phase variation and is regulated at the transcriptional level. *J. Bacteriol.* **183**:1540-1551.
81. **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.
82. **LeBoit, P. E., T. G. Berger, B. M. Egbert, T. S. Yen, M. H. Stoler, T. A. Bonfiglio, J. A. Strauchen, C. K. English, and D. J. Wear.** 1988. Epithelioid haemangioma-like vascular proliferation in AIDS: manifestation of cat scratch disease bacillus infection? *Lancet* **1**:960-963.

83. **Lei, Y., H. K. Haider, J. Shujia, and E. S. Sim.** 2004. Therapeutic angiogenesis. Devising new strategies based on past experiences. *Basic Res. Cardiol.* **99**:121-132.
84. **Linke, D., T. Riess, I. B. Autenrieth, A. Lupas, and V. A. Kempf.** 2006. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol* **14**:264-270.
85. **Lucey, D., M. J. Dolan, C. W. Moss, M. Garcia, D. G. Hollis, S. Wegner, G. Morgan, R. Almeida, D. Leong, K. S. Greisen, and .** 1992. Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. *Clin. Infect. Dis.* **14**:683-688.
86. **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.
87. **Maggi, R. G., A. W. Duncan, and E. B. Breitschwerdt.** 2005. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *bartonella* species. *J Clin. Microbiol* **43**:2651-2655.
88. **Maguina, C., P. J. Garcia, E. Gotuzzo, L. Cordero, and D. H. Spach.** 2001. Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. *Clin. Infect. Dis.* **33**:772-779.
89. **Margileth, A. M.** 1993. Cat scratch disease. *Adv. Pediatr. Infect Dis.* **8**:1-21.
90. **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.
91. **Martin, P., K. Makepeace, S. A. Hill, D. W. Hood, and E. R. Moxon.** 2005. Microsatellite instability regulates transcription factor binding and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:3800-3804.
92. **Martin, P., d. van, V, N. Mouchel, A. C. Jeffries, D. W. Hood, and E. R. Moxon.** 2003. Experimentally revised repertoire of putative contingency loci in *Neisseria meningitidis* strain MC58: evidence for a novel mechanism of phase variation. *Mol. Microbiol* **50**:245-257.
93. **Maurin, M., R. Birtles, and D. Raoult.** 1997. Current knowledge of *Bartonella* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**:487-506.
94. **Maurin, M. and D. Raoult.** 1996. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:273-292.

95. **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.
96. **Metzen, E., U. Berchner-Pfannschmidt, P. Stengel, J. H. Marxsen, I. Stolze, M. Klinger, W. Q. Huang, C. Wotzlaw, T. Hellwig-Burgel, W. Jelkmann, H. Acker, and J. Fandrey.** 2003. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J. Cell Sci.* **116**:1319-1326.
97. **Mitobe, J., T. Morita-Ishihara, A. Ishihama, and H. Watanabe.** 2008. Involvement of RNA-binding protein Hfq in the post-transcriptional regulation of invE gene expression in *Shigella sonnei*. *J. Biol. Chem.* **283**:5738-5747.
98. **Müller, H. E.** 1992. *Rochalimea henselae*: Der Erreger von bakterieller Angiomatose, Peliosis hepatis und Septikämie, p. 741-743. *In* , Münch Med Waschr. 134.
99. **Musso, T., R. Badolato, D. Ravarino, S. Stornello, P. Panzanelli, C. Merlino, D. Savoia, R. Cavallo, A. N. Ponzi, and M. Zucca.** 2001. Interaction of *Bartonella henselae* with the murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response. *Infect. Immun.* **69**:5974-5980.
100. **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.
101. **Palmari, J., N. Teyssere, C. Dussert, and D. Raoult.** 1996. Image cytometry and topographical analysis of proliferation of endothelial cells in vitro during *Bartonella (Rochalimaea)* infection. *Anal. Cell Pathol.* **11**:13-30.
102. **Pannen, B. H.** 2007. [Normothermia and hypothermia from an anaesthesiological viewpoint]. *Anaesthesist* **56**:940-944.
103. **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, and .** 1990. Clinical and pathological features of bacillary *peliosis hepatis* in association with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **323**:1581-1586.

104. **Pugh, C. W. and P. J. Ratcliffe.** 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med* **9**:677-684.
105. **Raoult, D., P. E. Fournier, M. Drancourt, T. J. Marrie, J. Etienne, J. Cosserat, P. Cacoub, Y. Poinignon, P. Leclercq, and A. M. Sefton.** 1996. Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. *Ann. Intern. Med.* **125**:646-652.
106. **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.
107. **Regnery, R. L., B. E. Anderson, J. E. Clarridge, III, M. C. Rodriguez-Barradas, D. C. Jones, and J. H. Carr.** 1992. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J. Clin. Microbiol.* **30**:265-274.
108. **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.
109. **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.
110. **Resto-Ruiz, S. I., M. Schmiederer, D. Sweger, C. Newton, T. W. Klein, H. Friedman, and B. E. Anderson.** 2002. Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect. Immun.* **70**:4564-4570.
111. **rias-Stella, J., P. H. Lieberman, R. A. Erlandson, and J. rias-Stella, Jr.** 1986. Histology, immunohistochemistry, and ultrastructure of the verruga in Carrion's disease. *Am. J. Surg. Pathol.* **10**:595-610.
112. **Ricketts, W.** 1949. Clinical manifestations of Carrion's disease. *Arch. Intern. Med.* **84**:751-781.
113. **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.
114. **Ridder, G. J., C. C. Boedeker, K. Technau-Ihling, R. Grunow, and A. Sander.** 2002. Role of cat-scratch disease in lymphadenopathy in the head and neck. *Clin. Infect. Dis.* **35**:643-649.

115. **Ridge, G. E.** Cat flea (*Ctenocephalides felis* (Bouche)), *In* .
116. **Riess, T., S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Walzlein, U. Eehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf.** 2004. *Bartonella* adhesin A mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp. Med* **200**:1267-1278.
117. **Riess, T., S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Walzlein, U. Eehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf.** 2004. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp. Med* **200**:1267-1278.
118. **Riess, T., S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Walzlein, U. Eehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf.** 2004. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp. Med* **200**:1267-1278.
119. **Riess, T., G. Raddatz, D. Linke, A. Schafer, and V. A. Kempf.** 2007. Analysis of *Bartonella* adhesin A expression reveals differences between various *B. henselae* strains. *Infect Immun.* **75**:35-43.
120. **Risau, W.** 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**:671-674.
121. **Rodriguez-Barradas, M. C., J. C. Bandres, R. J. Hamill, J. Trial, J. E. Clarridge, III, R. E. Baughn, and R. D. Rossen.** 1995. In vitro evaluation of the role of humoral immunity against *Bartonella henselae*. *Infect. Immun.* **63**:2367-2370.
122. **Rolain, J. M., P. Brouqui, J. E. Koehler, C. Maguina, M. J. Dolan, and D. Raoult.** 2004. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1921-1933.
123. **Rolain, J. M., S. B. La, Z. Liang, B. Davoust, and D. Raoult.** 2001. Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2978-2980.
124. **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.
125. **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.

126. **Sander, A., T. Kaliebe, and W. Bredt.** 1996. [*Bartonella (Rochalimaea)* infections: cat-scratch disease and bacillary angiomatosis]. Dtsch. Med. Wochenschr. **121**:65-69.
127. **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.
128. **Schouls, L. M., D. P. Van, I, S. G. Rijpkema, and C. S. Schot.** 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch Ixodes ricinus ticks. J. Clin. Microbiol. **37**:2215-2222.
129. **Schwartzman, W. A.** 1992. Infections due to *Rochalimaea*: the expanding clinical spectrum [see comments]. Clin. Infect. Dis. **15**:893-900.
130. **Schwartzman, W. A., C. A. Nesbit, and E. J. Baron.** 1993. Development and evaluation of a blood-free medium for determining growth curves and optimizing growth of *Rochalimaea henselae*. J. Clin. Microbiol. **31**:1882-1885.
131. **Semenza, G. L.** 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. Curr. Opin. Genet. Dev. **8**:588-594.
132. **Skurnik, M. and P. Toivanen.** 1992. LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. J Bacteriol. **174**:2047-2051.
133. **Slater, L. N., D. F. Welch, D. Hensel, and D. W. Coody.** 1990. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. N. Engl. J. Med. **323**:1587-1593.
134. **Slater, L. N., D. F. Welch, and K. W. Min.** 1992. *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. Arch. Intern. Med. **152**:602-606.
135. **Spach, D. H., A. S. Kanter, M. J. Dougherty, A. M. Larson, M. B. Coyle, D. J. Brenner, B. Swaminathan, G. M. Matar, D. F. Welch, R. K. Root, and .** 1995. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. N. Engl. J. Med. **332**:424-428.
136. **Stein, A. and D. Raoult.** 1995. Return of trench fever. Lancet **345**:450-451.
137. **Stoler, M. H., T. A. Bonfiglio, R. T. Steigbigel, and M. Pereira.** 1983. An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. Am. J. Clin. Pathol. **80**:714-718.

138. **Takayama, S. J., Y. T. Takahashi, S. Mikami, K. Irie, S. Kawano, Y. Yamamoto, H. Hemmi, R. Kitahara, S. Yokoyama, and K. Akasaka.** 2007. Local conformational transition of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome c552 relevant to its redox potential. *Biochemistry* **46**:9215-9224.
139. **Tappero, J. W., J. E. Koehler, T. G. Berger, C. J. Cockerell, T. H. Lee, M. P. Busch, D. P. Stites, J. Mohle-Boetani, A. L. Reingold, and P. E. LeBoit.** 1993. Bacillary angiomatosis and bacillary splenitis in immunocompetent adults. *Ann. Intern. Med.* **118**:363-365.
140. **Tappero, J. W., J. Mohle-Boetani, J. E. Koehler, B. Swaminathan, T. G. Berger, P. E. LeBoit, L. L. Smith, J. D. Wenger, R. W. Pinner, C. A. Kemper, and .** 1993. The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis. *JAMA* **269**:770-775.
141. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**:145-149.
142. **Verma, A., G. E. Davis, and G. M. Ihler.** 2000. Infection of human endothelial cells with *Bartonella bacilliformis* is dependent on Rho and results in activation of Rho. *Infect. Immun.* **68**:5960-5969.
143. **Watts, D. D., A. Trask, K. Soeken, P. Perdue, S. Dols, and C. Kaufmann.** 1998. Hypothermic coagulopathy in trauma: effect of varying levels of hypothermia on enzyme speed, platelet function, and fibrinolytic activity. *J. Trauma* **44**:846-854.
144. **Wear, D. J., A. M. Margileth, T. L. Hadfield, G. W. Fischer, C. J. Schlagel, and F. M. King.** 1983. Cat scratch disease: a bacterial infection. *Science* **221**:1403-1405.
145. **Welch, D. F., D. A. Pickett, L. N. Slater, A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner.** 1992. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J. Clin. Microbiol.* **30**:275-280.
146. **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.
147. **Windsor, J. J.** 2001. Cat-scratch disease: epidemiology, aetiology and treatment. *Br. J. Biomed. Sci.* **58**:101-110.

148. **Wong, M. T., M. J. Dolan, C. P. Lattuada, Jr., R. L. Regnery, M. L. Garcia, E. C. Mokulis, R. A. LaBarre, D. P. Ascher, J. A. Delmar, J. W. Kelly, and .** 1995. Neuroretinitis, aseptic meningitis, and lymphadenitis associated with *Bartonella (Rochalimaea) henselae* infection in immunocompetent patients and patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Infect. Dis.* **21**:352-360.
149. **Wong, M. T., D. C. Thornton, R. C. Kennedy, and M. J. Dolan.** 1995. A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea (Bartonella) henselae* from blood and tissue specimens. *J. Clin. Microbiol.* **33**:742-744.
150. **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.
151. **Zetter, B. R.** 1998. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu. Rev. Med.* **49**:407-424.
152. **Zhang, P., B. B. Chomel, M. K. Schau, J. S. Goo, S. Droz, K. L. Kelminson, S. S. George, N. W. Lerche, and J. E. Koehler.** 2004. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:13630-13635.

9 Publikation

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

10 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Volkhard Kempf bedanke ich mich herzlich für seine umfangreiche Betreuung und Unterstützung, seine stets positive Einstellung zu Versuchsergebnissen und seiner gründlichen Korrektur dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Ingo Autenrieth danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Tanja Rieß für ihre Unterstützung bei den Experimenten, ihr tolles Engagement und für die Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Dank an PD Dr. Christiane Wolz und Dr. Christiane Goerke für ihre hervorragende Unterstützung, Vitty Bisanzio und Marc Burian für die praktische Hilfe und der restlichen Arbeitsgruppe Wolz für den netten Umgang.

Andrea Schäfer und Diana Neumann habe ich zu danken für ihre große Geduld während der Einarbeitung ins Laborleben und ihrer Hilfe bei vielen Versuchen.

Für die gute Stimmung im Labor, das fleißige Helfen beim Abernten und Ausplattieren zahlreicher Agarplatten, sowie der Unterstützung außerhalb des Labors möchte ich mich vor allem bei Andrea Schäfer, aber auch den anderen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Amro Amr, Florian Dietrich, Christian Eberhardt, Hanna Hartmann, Patrick Kaiser, Diana Neumann, Tanja Rieß und Nadine Werth bedanken.

Allen anderen hier nicht erwähnten Institutsmitarbeitern danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank an Dr. Silke Dorner (MPI Tübingen, jetzt M.F. Perutz Laboratories, University of Vienna) für das Einführen im Umgang mit Schneiderzellen und

dem Überlassen derselbigen, der schnellen Hilfe bei Fragen und der Unterstützung bei der Literaturrecherche.

Heinz Schwarz (MPI Tübingen) sei gedankt für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Bilder dieser Arbeit.

Der Arbeitsgruppe um Dr. Verena Jendrossek herzlichen Dank für das Überlassen des Hypoxieschranks.

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Freund Thomas bedanken, auf die ich stets zählen kann und mich auf meinem bisherigen Weg unterstützt haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katja Vanessa Schmidt
Adresse: Rhenastr. 17, 75245 Neulingen-Bauschlott
Geburtsdatum: 18.03.1983
Geburtsort: Pforzheim, Baden-Württemberg

Schulbildung

1989-1993: Friedrich Weinbrenner Grundschule Bauschlott
1993-2002: Kepler-Gymnasium Pforzheim
2002: Abitur (Notendurchschnitt 1,5)

Studium

10/2002-09/2005: Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen (Semester 1-6)
8/2004: Physikum
10/2005-jetzt: Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Semester 7-12)

Promotion

04/2006-06/2008 Promotion am Institut für medizinische Mikrobiologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zum Thema:
„Untersuchungen zur Regulation der Expression des *Bartonella*-Adhäsins A (BadA) Gens von *Bartonella henselae*“
13/11/2008 Ärztliche Prüfung