

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl Bakteriologie
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

**Induktion von vaskulo-endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF) durch
*Bartonella henselae***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bettina Volkmann
aus Fürstenfeldbruck

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. I. B. Autenrieth

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. St. Linder
Prof. Dr. T. Löscher

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. V. A. J. Kempf

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2004

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1. | <u>Einleitung</u> | 1 |
| 1.1. | Die Gattung Bartonella | 1 |
| 1.1.1. | Taxonomie und Geschichte | 1 |
| 1.1.2. | Mikrobiologische Charakteristika von <i>Bartonella spp.</i> | 2 |
| 1.1.3. | Pathogenese von <i>Bartonella</i> - Infektionen | 2 |
| 1.1.4. | Erregertransmission durch Katzen | 4 |
| 1.1.5. | Epidemiologie | 5 |
| 1.1.6. | Klinisches Spektrum von <i>Bartonella henselae</i> - Infektionen | 6 |
| 1.1.6.1. | Katzenkratzkrankheit | 6 |
| 1.1.6.2. | Bazilläre Angiomatose | 8 |
| 1.1.6.3. | Peliosis hepatis | 9 |
| 1.1.7. | Diagnose und Therapie | 9 |
| 1.2. | Angiogenese | 10 |
| 1.3. | Zytokine | 12 |
| 1.3.1. | Das Zytokin Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) | 13 |
| 1.3.1.1. | Isoformen | 13 |
| 1.3.1.2. | Regulation der VEGF-Produktion | 14 |
| 1.3.1.3. | Rezeptoren | 15 |
| 1.3.2. | Das Zytokin Interleukin-8 (IL-8) | 15 |
| 1.4. | Zielsetzung dieser Arbeit | 16 |
| 2. | <u>Material und Methoden</u> | 17 |
| 2.1. | Material | 17 |
| 2.1.1. | Geräte | 17 |
| 2.1.2. | Sonstige Materialien | 18 |
| 2.1.3. | Chemikalien | 18 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.1.4. | Antibiotika | 19 |
| 2.1.5. | Radioaktivität | 19 |
| 2.1.6. | Proteine und Enzyme | 19 |
| 2.1.7. | Rekombinante Zytokine | 20 |
| 2.1.8. | Antikörper | 20 |
| 2.1.9. | Zelllinien | 20 |
| 2.1.10. | Bakterienstämme | 20 |
| 2.1.11. | Medien | 21 |
| 2.1.12. | Zellbiologisch wirksame Substanzen | 22 |
| 2.1.13. | Synthetische Oligonukleotide | 22 |
| 2.1.14. | Puffer und Lösungen für Agarosegel-Elektrophorese | 23 |
| 2.1.15. | ELISA | 23 |
| 2.1.15.1. | VEGF-ELISA | 23 |
| 2.1.15.2. | IL-8-ELISA | 23 |
| 2.2. | Methoden | 24 |
| 2.2.1. | Bakterien | 24 |
| 2.2.1.1. | Bakterienherstellung für <i>in vitro</i> Infektionen | 24 |
| 2.2.1.2. | Herstellung von hitzegetöteten Bakterien für <i>in vitro</i> Untersuchungen | 24 |
| 2.2.1.3. | Herstellung von sonifizierten Bakterien für <i>in vitro</i> Untersuchungen | 24 |
| 2.2.1.3. | Herstellung Pilus-negativer <i>Bartonella henselae</i> - Spontanvarianten | 25 |
| 2.2.2. | Zellkultur | 25 |
| 2.2.2.1. | Wachstumsbedingungen und Zellkulturtechniken | 25 |
| 2.2.2.2. | Einfrieren von Zellen | 26 |
| 2.2.2.3. | Infektionsexperimente | 26 |
| 2.2.2.4. | Modulation der Infektionsexperimente | 27 |
| 2.2.2.5. | Adhärenz und Invasion von <i>Bartonella henselae</i> (Gentamycin-protection-assay) | 27 |
| 2.2.2.6. | Gewinnung von Zellkulturüberständen | 28 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.2.3. | Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen: ELISA | 28 |
| 2.2.3.1. | VEGF-ELISA | 28 |
| 2.2.3.2. | IL-8-ELISA | 29 |
| 2.2.4. | Bestimmung der VEGF-mRNA Transkripte | 29 |
| 2.2.4.1. | Isolierung der Gesamt-RNA | 30 |
| 2.2.4.2. | Maßnahmen im Umgang mit RNA | 31 |
| 2.2.4.3. | Bestimmung der RNA-Menge über die Opische Dichte | 31 |
| 2.2.4.4. | Reverse Transkription | 32 |
| 2.2.4.5. | Polymerase Kettenreaktion (PCR) | 33 |
| 2.2.4.6. | Gelelektrophorese der PCR-Produkte | 34 |
| 2.2.5. | VEGF-Proliferationsassays mit Endothelzellen | 35 |
| 2.2.6. | Doppelimmunfluoreszenz | 36 |
| 2.2.7. | Statistik | 37 |
| 3. | <u>Ergebnisse</u> | 38 |
| 3.1. | Nachweis der VEGF Produktion in EA.hy 926, HUVEC, CRL-1999 und Hela 229 -Zellen nach <i>Bartonella henselae</i> – Infektion | 38 |
| 3.1.1. | Nachweis der VEGF Produktion mittels ELISA | 38 |
| 3.1.2. | Nachweis der VEGF Produktion mittels RT-PCR | 42 |
| 3.2. | Infektion von EA.hy 926 und HUVEC mit <i>Bartonella henselae</i> und Nachweis der IL-8 Produktion | 44 |
| 3.2.1. | Nachweis der IL-8 Produktion mittels ELISA | 44 |
| 3.3. | Modulation der VEGF-Synthese | 46 |
| 3.4. | Untersuchungen zur Natur des VEGF-induzierenden Faktors von <i>B. henselae</i> | 48 |
| 3.4.1. | Induktion von VEGF durch <i>Bartonella henselae</i> : Dosis-Wirkungs-Kurve | 48 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 3.4.2. | Kokultur von EA.hy 926 Zellen mit hitzegetöteten <i>Bartonella hensela</i> : Dosis-Wirkungs-Kurve | 48 |
| 3.4.3. | Kokultur von EA.hy 926 Zellen mit <i>Bartonella henselae</i> – Sonifikaten | 48 |
| 3.5. | Spezifitätskontrolle der VEGF-Induktion | 49 |
| 3.6. | Untersuchungen zum Einfluß der Pilusexpression auf die VEGF-Produktion in EA.hy 926 Zellen | 50 |
| 3.6.1. | Induktion der VEGF-Produktion durch <i>B. henselae</i> Pil ⁺ und <i>B. henselae</i> Pil ⁻ | 51 |
| 3.6.2. | Untersuchungen zur Rolle der Pili von <i>B. henselae</i> bei Adhäsion an und Invasion in EA.hy 926 Zellen | 51 |
| 3.7. | Vaskuloproliferativer Effekt der konditionierten Medien | 53 |
| 3.7.1. | Nachweis eines vaskuloproliferativen Effektes von konditionierten Medien mittels ³ H-Thymidin Proliferationsassay | 53 |
| 3.7.2. | Nachweis eines vaskuloproliferativen Effektes von konditionierten Medien mittels Phasenkontrastmikroskopie | 53 |
| 3.8. | Replikation von <i>Bartonella henselae</i> in proliferierenden Endothelzellen | 55 |
| 4. | <u>Diskussion</u> | 57 |
| 4.1. | Induktion von Vaskuloproliferationen durch <i>Bartonella henselae</i>: die Rolle von VEGF | 57 |
| 4.2. | Abhängigkeit der <i>B. henselae</i>-induzierten VEGF-Produktion vom Zelltyp | 58 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.3. | Bakterien-induzierte Vaskuloproliferationen und deren Entstehungsmechanismus: spezifisch für <i>Bartonella henselae</i>? | 59 |
| 4.4. | Mechanismen der Bakterien-Wirt-Interaktion | 60 |
| 4.4.1. | Einfluss der Pili auf die VEGF-Induktion | 60 |
| 4.4.2. | Einfluss des Aktinskeletts auf die VEGF-Produktion | 61 |
| 4.5. | Neusynthese von VEGF nach <i>Bartonella henselae</i>-Infektion | 62 |
| 4.6. | Die Rolle weiterer vaskuloproliferativer Zytokine in der <i>Bartonella henselae</i>-Infektion | 63 |
| 4.7. | Induktion einer Endothelzellproliferation durch <i>Bartonella henselae</i>: “paracrinic loop modell” | 64 |
| 4.8. | Ausblick | 66 |
| 5. | <u>Zusammenfassung</u> | 68 |
| 6. | <u>Literaturverzeichnis</u> | 70 |
| 7. | <u>Abkürzungen</u> | 96 |
| 8. | <u>Danksagung</u> | 100 |
| 9. | <u>Publikationen und Kongressbeiträge</u> | 101 |
| 10. | <u>Lebenslauf</u> | 103 |

1. Einleitung

1.1. Die Gattung *Bartonella*

1.1.1. Taxonomie und Geschichte

Die Gattung *Bartonella* ist seit langer Zeit als humanpathogen bekannt. Bis jetzt wurden 15 Spezies gefunden, von denen allerdings nur fünf als humanpathogen gelten (4).

Das zuerst entdeckte Bakterium der Gattung war *Bartonella bacilliformis*, der Erreger der Carrion'schen Krankheit, die nur endemisch in den Anden Südamerikas auftritt, und von Sandfliegen der Gattungen *Lutzmyia* und *Phlebotomus* auf den Menschen übertragen wird. Die Bartonellose verläuft in zwei Schüben. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 6 Wochen kommt es zu einer hämolytischen Anämie, begleitet von hohem intermittierendem Fieber, mit hoher Letalität. Überlebt der Infizierte die Erkrankung kann es Wochen bis Monate nach dem Fieber zu noduloverrukösen teleangiektatischen Granulomen an Gesicht und Extremitäten kommen (148). Mitte des 19. Jahrhunderts erhielt diese Krankheit den Namen Oroya-Fieber, da ihm beim Bau der Eisenbahnlinie zwischen Lima und La Oroya etwa 10000 Arbeiter zum Opfer fielen. Daniel Carrion konnte 1885 in einem tödlichen Selbstversuch den Zusammenhang zwischen der Verruga peruana, der chronisch-lokalisierter Form und der septischen Variante, dem Oroya-Fieber nachweisen (86).

Bartonella quintana, der Erreger des Fünf-Tage-Fiebers (173) rief in den beiden Weltkriegen große Epidemien unter den Soldaten hervor, weswegen die Krankheit auch Schützengrabenfieber genannt wurde. 1917 wurde der Erreger noch als *Rickettsia quintana* beschrieben, jedoch 1961 in *Rochalimaea quintana* umbenannt (108). Nach dem Rückgang der Epidemien nahm auch das Interesse an *Bartonella quintana* ab, bis der Erreger 1992 als Ursache der Bazillären Angiomatose identifiziert wurde (105).

Bartonella henselae wurde erstmals 1990 aus dem Blut eines HIV- Infizierten isoliert und als Ursache von Fieber und Bakteriämien identifiziert (167). *B. henselae* konnte ebenfalls mit der Entstehung der Bazillären Angiomatose (147, 189) und weiteren Krankheitsbildern (siehe Kapitel 1.1.6.) (142, 145, 170, 171) in Verbindung gebracht werden. Erst 1992 wurde *Bartonella henselae* charakterisiert und nach der medizinisch-technischen Assistentin Diane Hensel benannt (141).

Die Spezies *Bartonella elizabethae* wurde erstmals 1993 als Endokarditiserreger identifiziert (38), obwohl schon 1986 ein ähnliches nicht identifizierbares Bakterium aus dem Blut eines Patienten mit Endokarditis isoliert wurde.

Lange Zeit wurde der Gattung *Bartonella* nur die Spezies *Bartonella bacilliformis* zugeordnet. Erst nachdem 1993 die große genetische und molekularbiologische Übereinstimmung (16S RNA und DNA – Analysen) zwischen den Bakterien der Gattung *Rochalimaea* und *Bartonella bacilliformis* festgestellt werden konnte (131), wurden alle Spezies der Gattung *Rochalimaea* der Gattung *Bartonella* zugeordnet (15), und in *Bartonella quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae* und *B. vinsonii* umbenannt. In den folgenden Jahren wurden weitere Arten beschrieben, wovon allerdings nur *Bartonella clarridgeiae* gesichert humanpathogen ist, die zusammen mit *Bartonella henselae* 1995 aus dem Blut eines HIV-positiven mit Katzenkratzkrankheit („cat scratch disease“, CSD) isoliert wurde (32).

1.1.2. Mikrobiologische Charakteristika von *Bartonella* spp.

Bei Bakterien der Gattung *Bartonella* handelt es sich um gramnegative Stäbchen, die fakultativ intrazellulär wachsen und auf unbelebten Nährmedien anspruchsvoll und langsam wachsend sind. Die Keime sind etwa 2 µm lang und 0,5 – 0,6 µm breit (141). *In vitro* sind *B. henselae* nur in Zellkultur oder auf Schokoladen-, Kochblut- oder Hämin-angereichertem Agar bei 35 – 37°C, erhöhter Feuchtigkeit und 5% CO₂ kultivierbar (47). In Flüssigkulturmedien wachsen sie nur unzureichend (Replikation in 10 Tagen etwa 100fach (A. Sander, Freiburg, pers. Mitteilung, (47))). Bei Kultivierung auf Blut-Agar sind Inkubationszeiten von 2 – 8 Wochen nötig bis zum Auftreten deutlich sichtbarer Kolonien. In Flüssigkeit weisen *B. henselae* Motilität auf, die möglicherweise auf Piliexpression zurückzuführen ist. Nach längeren Passagezeiten auf Blut-Agar verlieren die Bakterien diese Eigenschaft (10).

1.1.3. Pathogenese von *Bartonella*-Infektionen

Obwohl durch *Bartonellen* hervorgerufene Erkrankungen bereits seit langer Zeit bekannt sind, in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl weiterer klinischer Manifestationen entdeckt wurde (Katzenkratzkrankheit, bazilläre Angiomatose, bazilläre Peliosis, Otitis, Enzephalitis) (9, 39, 45, 48, 66, 96, 110, 111, 113, 164, 177, 191), und die Beteiligung des Erregers an weiteren Erkrankungen diskutiert wird (z.B.

Ileitis, (122)), ist nur sehr wenig über die Pathogenitätsfaktoren und die Interaktionen zwischen Erreger und Mensch bekannt. Es hat sich in vielen Fallstudien jedoch gezeigt, dass die schwersten Manifestationen bei geschwächter zellulärer Immunität, z.B. HIV, auftreten (21, 96, 104, 110, 111, 163, 174, 198).

Die Rolle der humoralen Immunität gegen *B. henselae* wurde *in vitro* bereits untersucht (151). Die Spezies reagierte sehr sensibel auf komplementvermittelte Zytolyse. Lipopolysaccharide des gramnegativen Bakteriums binden C3 und aktivieren somit den alternativen Weg der Komplement-Aktivierung. Zudem wurde gezeigt, dass *B. henselae* den klassischen Weg der Komplement-Aktivierung ohne Anwesenheit von spezifischen Antikörpern zu initiieren vermag. Weiterhin konnten spezifische Antikörper die Phagozytose von *B. henselae* durch polymorphkernige Leukozyten signifikant erhöhen und die nach Internalisation generierten Sauerstoffradikale verstärken (83).

Kürzlich wurde gezeigt, dass die persistierende *B. grahamii* - Bakteriämie bei immunsupprimierten Mäusen nach Gabe von spezifischem Antikörperserum den gleichen transienten Verlauf nahm, wie bei immunkompetenten Mäusen (106).

Persistierende Bakteriämien mit *B. henselae* wurden besonders bei Immunsupprimierten (21, 141, 167), aber auch bei Immunkompetenten (115) beschrieben. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese einer intrazellulären Persistenz des Erregers im Wirt, um dessen Abwehrmechanismen zu umgehen. Die Tatsachen, (I) dass nur Antibiotika therapiewirksam sind, die gut in Zellen penetrieren, (II) dass die Infektion die Tendenz hat, zu rezidivieren und (III) dass im Vergleich zum konventionellen Ausplattieren größere Keimzahlen aus Blutkulturen durch Verwendung eines Lysezentrifugationssystems erreicht wurden (17), bestärken diese Hypothese.

Damit *B. henselae* durch die intrazelluläre Persistenz sein Überleben sichern kann, hat der Erreger einige Mechanismen entwickelt, um gut in die Wirtszellen eindringen zu können. Ein wichtiger Schritt hierbei ist die Adhäsion der Bakterien an seine Wirtszellen. Wie bei vielen Erregern sind Oberflächenkomponenten von großer Wichtigkeit für diesen Pathomechanismus. Bei *B. henselae* konnten bislang 9 Oberflächenmembranproteine (outer membrane proteins = OMP) mit 28, 30, 35, 43, 58, 61, 79, 92 und 171 kDa identifiziert werden. Dabei scheint das 43 kDa OMP an intakte Endothelzellen (HUVECs) zu binden. (20).

Ein weiterer Pathogenitätsfaktor bei der Adhäsion an und Invasion in Wirtszellen ist die Piliexpression (ähnlich Typ-4 Pili) von *B. henselae*. So wurde gezeigt, dass *B. henselae*-

Varianten, die durch lange Passagezeiten ihre Fähigkeit zur Piliexpression verloren haben, eine deutlich geringere Adhäsion und Invasion zeigen als Pili-tragende *B. henselae* nach niedriger Passagezeit (10).

Weiterhin wurde gezeigt, dass *B. henselae* über ein Typ IV - Sekretionssystem verfügt, das große Homologien zu dem von *Agrobacterium tumefaciens* aufweist. Dieses Typ IV System ist ein pilitragender Multiproteinkanale der durch innere und äußere Bakterienmembran verläuft. Bei *A. tumefaciens* ist er beispielsweise für die Einschleusung der Tumor-induzierenden DNA (T-DNA) in die Pflanzenzellen verantwortlich. Die Rolle des Typ IV - Sekretionssystems von *B. henselae* ist bislang unklar, es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Interaktion von *B. henselae* mit Endothelzellen zu einer Aktivierung des Typ IV - Sekretionssystems führt (157).

Eine weitere Möglichkeit zur Adhäsion und Invasion besteht für *B. henselae* durch die Ausbildung von bakteriellen Aggregaten auf der Zelloberfläche, gefolgt von der Umschließung des Aggregates durch Zellausläufer und der vollständigen Internalisierung des sog. Invasoms (40).

1.1.4. Erregertransmission durch Katzen

Außer epidemiologischen Daten gibt es auch serologische Beweise dafür, dass die Hauskatze in einem direkten Zusammenhang mit der Übertragung von *B. henselae* steht. So wurde *B. henselae* als Erreger der Bazillären Angiomatose bei vier Patienten nachgewiesen, die über längere Zeit Kontakt zu sieben bakteriämischen asymptomatischen Katzen hatten (103). *B. henselae* konnte außerdem durch PCR und Kultur aus Katzenflöhen dieser bakteriämischen Katzen nachgewiesen werden, so dass angenommen wurde, dass neben direkten Verletzungen durch die Katze auch diese Katzenflöhe als Vektoren dienen.

Ähnliche Ergebnisse fanden auch Kordick et al. (107). Von den untersuchten Katzen der an CSD erkrankten Patienten waren 89% seropositiv, wogegen es in der Kontrollgruppe nur 28% waren. Diese und andere Studien (197) untermauern die Bedeutung der Katzen bei der Übertragung von *B. henselae* auf den Menschen. Dabei zeigen junge Katzen signifikant häufiger Bakteriämien mit *B. henselae* als ältere Katzen (29, 75).

1.1.5. Epidemiologie

Es gibt zahlreiche Publikationen über die Prävalenz von humanen Infektionen mit *Bartonella spp.* in den USA. So ermittelten Zangwill et al., dass bei 4-6% der gesunden Population *Bartonella*-spezifische Antikörper nachweisbar sind. 80% der Patienten mit Katzenkratzkrankheit waren jünger als 21 Jahre und mehr als 90% hatten Kontakt zu Katzen. Bei der untersuchten Patientengruppe mit bazillärer Angiomatose hatten allerdings nur weniger als 20% der Patienten Katzenkontakt (197).

Sander et al. fanden in einem Kollektiv von CSD-Patienten in Deutschland heraus, dass 81% eine mit *B. henselae* infizierte Katze als Haustier hatten. In der Kontrollgruppe gesunder Katzenbesitzer waren nur 38% der Katzen mit *B. henselae* durchseucht (155). Studien über die Prävalenz von *Bartonella spp.* bei Katzen ergaben, dass vor allem junge Katzen *B. henselae* - Bakteriämien haben (29, 75, 81, 107, 143). Weitere Untersuchungen über die Prävalenz von *Bartonella spp.* bei Katzen (29, 77, 80, 87, 107, 154, 197) wurden beschrieben. In der Gegend um San Francisco sind ca. 41% der Hauskatzen mit *B. henselae* infiziert (107). In der Region um Freiburg in Deutschland wird von einer Seroprävalenz der *B. henselae* - Infektionen bei Katzen von etwa 13% berichtet (154, 155). Chomel et al. fanden bei Katzen in Nordamerika eine Seroprävalenz von 81%, nur bei 39,5% gelang eine Erregerisolation (30).

Nach der Untersuchung von 713 Katzenseren aus Nord- und Süddeutschland ergab sich, dass 6 – 15 % der Katzen seropositiv waren. Außerdem wurde in dieser Studie eine leicht erhöhte Seroprävalenz in Norddeutschland, im Gegensatz zu Süddeutschland gefunden. Dies könnte auf gewisse klimatisch bedingte, geographische Unterschiede bei der Verteilung von *B. henselae* hinweisen (78).

Wahrscheinlich wird die Transmission von *B. henselae* von Katze zu Katze und von Katze zu Mensch durch Anthropoden von klimatischen Bedingungen beeinflusst. So zeigt die Prävalenz von Katzenflöhen in den USA eine eindeutig positive Korrelation mit einem feuchten und warmen Klima (87).

Bekannt ist diese klimatische Beeinflussung der Epidemiologie schon von der durch Zecken übertragenen Borreliose. Auch hier findet sich eine deutlich höhere Erkrankungsrate in gemäßigten bis wärmeren Gebieten (südliche USA, Mitteleuropa) vor allem im Sommer und Herbst, wo die Bißaktivität der Zecken zunimmt. Kürzlich wurde die Rolle von Zecken in der Transmission von *B. henselae* diskutiert (160).

1.1.6. Klinisches Spektrum von *Bartonella henselae* - Infektionen

Bartonella henselae kann ein breites Spektrum an Erkrankungen beim Menschen hervorrufen, wie Katzenkratzkrankheit, Bazilläre Angiomatose (BA), Bazilläre Peliosis (BP), Endokarditis, Enzephalitis, Osteomyelitis und eine Vielzahl weiterer Organmanifestationen (siehe Tabelle 1).

Tab. 1 : Durch *Bartonella henselae* hervorgerufene Erkrankungen

| Erkrankung | Auftreten | Nachweis | Zitat |
|---|--|----------------------------------|------------------------------------|
| 1. Katzenkratzkrankheit (KKK oder CSD) | Lymphadenopathie, in 90% selbstlimitierend, atypischer Verlauf 10%, abhängig vom Immunstatus | Serologie, PCR, Kultur | (47, 144) |
| vaskuloproliferative Erkrankungen: | | | |
| 2. Bazilläre Angiomatose (BA) | meist bei HIV-Infizierten, | Histologie, Crocott-Färbung, PCR | (110, 111, 168) |
| 3. Bazilläre Peliosis (BP) | seltener bei Gesunden | | |
| Weitere Manifestationen: | | | |
| 4. Endokarditis | Art der Manifestation und des Verlaufs abhängig vom Immunstatus des Infizierten | Kultur, PCR, Serologie | (73, 111, 168, 139, 164, 177, 191) |
| 5. Enzephalitis | | | |
| 6. Osteomyelitis | | | |
| 7. systemische Manifestationen anderer innerer Organe (z.B. Lunge) | | | |

1.1.6.1. Katzenkratzkrankheit

Seit Debre und Lamy 1950 erstmals eine ausführliche klinische Beschreibung der Katzenkratzkrankheit lieferten, standen eine Vielzahl von Erregern im Verdacht, diese Krankheit hervorzurufen (39). Lange Zeit wurde die Diagnose CSD klinisch gestellt, wenn drei der folgenden vier Kriterien erfüllt waren:

1. Hautverletzung durch eine Katze, 2. positiver Hauttest nach Hangar und Rose, d.h. positive Reaktion auf ein intradermal injiziertes Antigen, das aus einem befallenen Lymphknoten präpariert wurde, 3. charakteristische histologische Lymphknotenläsionen und 4. negative Laborbefunde für andere Ursachen der Lymphadenopathie.

1988 kam ein neu entdecktes Bakterium, das aus Lymphknoten eines Patienten mit CSD isoliert (53) und nach seiner vollständigen Charakterisierung 1991 *Afipia felis* (*Afipia* nach dem Armed Forces Institute of Pathology, dem Ort der Erstisolierung, und *felis* nach dem angenommenen Infektionsüberträger, der Katze) benannt wurde (16), in den Verdacht, der Erreger der Krankheit zu sein. Doch schon ein Jahr später konnte gezeigt werden, dass 88% der Patienten Antikörper gegen *B. henselae*, nicht jedoch gegen *Afipia felis* aufwiesen (144). 1993 gelang es erstmals *B. henselae* direkt aus befallenen Lymphknoten zu isolieren und zu kultivieren (45) und den lange gesuchten Erreger der Katzenkratzkrankheit mittels Gesamtzellfettanalyse und PCR sicher zu identifizieren.

Obwohl sich die Suche nach dem Erreger über mehrere Jahrzehnte hinzog, war die Beschreibung des Krankheitsbildes immer erstaunlich gleichartig. CSD ist typischerweise eine gutartige, selbstlimitierende Erkrankung die ohne Antibiotikatherapie 6 – 12 Wochen andauert. In 50 – 75 % der Fälle bildet sich an der Stelle der Hautläsion nach 4 – 6 Tagen eine Papel oder Pustel aus. Ihr folgt nach 7 – 50 Tagen eine regionäre Lymphadenopathie, die in der Hälfte der Fälle das einzige Symptom ist. 80 % der befallenen Lymphknoten befinden sich an Kopf, Nacken oder den oberen Extremitäten (186, 191, 197). Bei 50 % der Patienten treten zusätzlich leichtes Fieber, Kopfschmerzen oder Unwohlsein auf. Des weiteren können sich noch Übelkeit, Gewichtsverlust, Halsschmerzen und Splenomegalie entwickeln. Histologisch sieht man in den Lymphknoten eine nekrotisierende granulomatöse Entzündungsreaktion mit lymphatischen Infiltraten und mehrkernigen Riesenzellen. In 15 % der Erkrankungen kommt es zu einer Abszedierung der befallenen Lymphknoten (4, 124, 186).

Atypische Manifestationen der CSD treten nur in 10 % der Fälle auf, sind aber sehr vielfältig. Die häufigste Komplikation ist das Perinaud'sche okuloglanduläre Syndrom (6%), gefolgt von Enzephalitis, zerebraler Arteriitis, Radikulitis, Myelitis, granulomatöse Hepatitis oder Splenitis (73), atypischer Pneumonie, hilärer Adenopathie, Pleuraerguß, Osteomyelitis, Erythema nodosum und Erythema annulare (23, 111, 118, 119, 164, 191). Jedes Jahr werden in den USA mehr als 40000 Fälle von Katzenkratzkrankheit gemeldet (181).

1.1.6.2. Bazilläre Angiomatose (BA)

Von der Bazillären Angiomatose sind in erster Linie Immunsupprimierte, vor allem HIV-positive Patienten betroffen. Die Krankheit wurde 1983 erstmals bei AIDS-Kranken beschrieben (35, 174) und gilt nach dem U. S. Center for Disease Control and Prevention als AIDS definierende Krankheit. Sie kann jedoch ebenso Immunkompetente betreffen (13, 33, 34, 147, 177, 178).

Der Name Bazilläre Angiomatose wurde 1989 von LeBoit (110) geprägt. Er beschreibt treffend die Pathogenese (infektiös, bakteriell) und die Histologie (Angiomatose) der Erkrankung. Als Krankheitserreger wurden sowohl *B. henselae* als auch *B. quintana* nachgewiesen (105). Klinisch handelt es sich um einzeln oder multipel auftretende, kutane oder subkutane Läsionen, die meist ein derbes rötlich-livides Aussehen haben und damit dem Kaposi's-Sarkom morphologisch ähneln.



Abb. 1: kutane Form der bazillären Angiomatose bei einem HIV-Patienten.
(http://edcenter.med.cornell.edu/Pathophysiology_Cases/HIV/Cutaneous_Manifestations/4976.gif)

Charakteristisch sind lobuläre kapilläre Gefäßproliferationen epitheloider teilweise atypischer Endothelzellen, die Blutgefäße auskleiden und teilweise in das Lumen hineinragen. Oft finden sich entzündliche Infiltrate, die Bakterien, neutrophile Granulozyten und leukozytoklastischen Debris enthalten (1). Viszerale Manifestationen

der bazillären Angiomatose (z. B. Peliosis hepatis) wurden in den verschiedensten Organsystemen beschrieben (177, 189).

Nach Mohle-Botani gibt es drei klinische Bilder der Bazillären Angiomatose bei HIV-Patienten, die eventuell auch untereinander kombiniert sein können: (I) Hautläsionen (bei 50 % der betroffenen Patienten), (II) abdominelle Symptome (als einzige klinische Manifestation bei 20 % der betroffenen Patienten) und (III) Fieber und Lymphadenopathie (20 % als einzige klinische Manifestation) (126).

1.1.6.3. Peliosis hepatis

Die bazilläre Peliosis hepatis (BP) ist eine seltene vaskuloproliferative Hepatopathie. Meist sind HIV-Infizierte betroffen. Gelegentlich ist sie mit einer Peliosis splenica assoziiert. Charakteristisch sind dilatierte Lebersinusoide und zystisch-gekammerte, blutgefüllte Endothelzell-Proliferationen, umgeben von myxoidem Stroma (104, 164). Klinisch zeigen sich Fieber, Abdominalschmerzen, Gewichtsverlust und Hepatomegalie (129).

Die Erkrankung wurde zuerst bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren oder nach Anabolikasteroid-Therapie beschrieben. *Bartonella henselae* wurde als neue Ursache der Peliosis hepatis bei HIV-Patienten beschrieben (135, 189).

In einem experimentellen Ansatz mit Melanom-/Gliomzellmäusen mit hohen VEGF-Serumspiegeln wurde von Wong et al. ein der Bazillären Peliosis sehr ähnlicher histologischer Befund beschrieben, was darauf hinweist, dass hohe VEGF-Spiegel auch bei der BP eine wichtige Rolle spielen (190).

1.1.7. Diagnose und Therapie

Zum serologischen Nachweis von Antikörpern bei einer *Bartonella henselae* - Infektion sind mittlerweile indirekte Immunfluoreszenztests kommerziell erhältlich. Bei Patienten mit Katzenkratzkrankheit konnten in 88% Antikörper gegen *Bartonella henselae* nachgewiesen werden, während in der Kontrollgruppe nur 3% positiv waren (144). ELISA und Westernblot werden vergleichend mit anderen serologischen Methoden eingesetzt (140, 144). Aus frischen oder formalinfixierten Gewebebiopsien kann ein DNA-Nachweis des Erregers durch PCR-Amplifikation und anschließender Hybridisierung, 16S rRNA-Sequenzierung oder Gesamtzellfettsäureanalyse versucht werden (3, 47, 124). Auch der kulturelle Nachweis der Bakterien aus Lymphknoten,

Abstrichen oder Lysiszentrifugations- oder Bactec-Kulturen kann erfolgreich verlaufen. Bei Verdacht auf Bazilläre Angiomatose erfolgt die Diagnostik primär aus Biopsaten entsprechender Hautläsionen. Die kulturelle Anzucht von Bartonellen ist allerdings schwierig und langwierig. Die Erregeranzucht in der Zellkultur ist die erfolgreichste Methode, aber auch sehr anspruchsvoll (109).

Bei der typisch verlaufenden Katzenkratzkrankheit genügt in der Regel eine konservative symptomatische Therapie. Eine antibiotische Behandlung mit z. B. Azithromycin ist meist nur bei Komplikationen erforderlich, bei stark vergrößerten oder eingeschmolzenen Lymphknoten ist auch eine Exzision oder Nadelaspiration hilfreich (70).

In der systemischen Therapie der bazillären Angiomatose gelten Clarithromycin und Azithromycin als Antibiotika der Wahl. Alternativ kommen auch Erythromycin, Doxycyclin oder Ciprofloxacin, aber auch Cotrimoxazol in Betracht (152). Bei schweren Infektionen sollte man eine Kombination von Doxycyclin und Rifampicin in Erwägung ziehen (70). Die Therapiedauer ist abhängig vom Immunstatus des Patienten. Bei Immunkompetenten sind meist 2-4 Wochen ausreichend, während bei HIV-Infizierten mindestens zwei Monate therapiert werden sollte (11).

1.2. Angiogenese

Unter „Angiogenese“ versteht man eine Blutgefäßneubildung aus bereits bestehenden Kapillaren und Venolen. Sie ist abzugrenzen von der Vaskulogenese, der primären Ausbildung des Gefäßsystems während der Embryonalzeit (26). Geprägt wurde der Begriff der Angiogenese 1935 von Hertig.

Die Angiogenese ist für die Entwicklung des Menschen während der Embryonalperiode von großer Bedeutung. Beim ausgereiften Individuum tritt sie nur noch in Ausnahmefällen auf, wenn ein vermehrtes Blutgefäßwachstum von Nöten ist, z.B. bei der Wundheilung oder dem Aufbau der Uterusschleimhaut (36).

Überwiegend ist die Neoangiogenese ein Kennzeichen von verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. Tumoren, Metastasen, diabetischer Retinopathie, rheumatoiden Erkrankungen, Psoriasis oder bazillärer Angiomatose (25, 59, 60, 61, 149) und aktueller Gegenstand der Erforschung neuer onkologischer Therapieansätze. Menschliche Zellen benötigen zu ihrer Versorgung Sauerstoff und Nährstoffe und können deshalb nur in einem Umkreis von 100-200 µm von Blutgefäßen überleben. Zum weiteren Wachstum

von Tumoren muß es also gleichzeitig zu einem Wachstum der Blutgefäße kommen. Ohne Gefäße können Tumore weder über eine kritische Größe wachsen, noch metastasieren. Die derzeit erforschten Therapiestrategien beschäftigen sich (I) mit der Blockierung angiogenetischer Liganden und deren Rezeptoren, (II) mit der Hochregulierung der endogenen Inhibitoren und (III) mit dem direkten Angriff der Tumorgefäße. Besonders für stark metastasierte Tumore sind die bestehenden Therapiemöglichkeiten oft begrenzt. Durch den Einsatz von antiangiogenetischen Therapieansätzen wäre es möglich, auch Tumormetastasen zu behandeln und eine weitere Streuung des Tumors zu verhindern (25, 199).

Eine bakterielle Induktion der Angiogenese ist derzeit einzig für Bartonellen bekannt. Die durch *B. henselae* und *B. quintana* hervorgerufenen Vaskuloproliferationen führen zu dem typischen Bild der bazillären Angiomatose (siehe oben). Auch für andere *Bartonella spp.* sind angiogenetische Krankheitsbilder bekannt, z.B. die durch *B. bacilliformis* hervorgerufene Verruga peruana. Die Induktion der Angiogenese durch andere infektiöse Agentien ist bereits bekannt für das humane Herpesvirus 8 (HHV 8) (121) und das Orf-Virus (125).

Man unterscheidet zwei verschiedene Formen der Angiogenese, „sprouting“ und „non-sprouting“. Bei letzterem handelt es sich um die Durchteilung bereits bestehender Gefäße durch Fortsätze der extrazellulären Matrix (149).

Sprouting läuft in vier Schritten ab. Zuerst erfolgt die Aktivierung durch einen Stimulus (z.B. Hypoxie, Zytokine, etc.). Dies führt zum Abbau der extrazellulären Matrix, die Zellen verändern ihre Form und migrieren in Richtung Stimulus. Die Zellen am Ende dieses Fortsatzes proliferieren und beginnen ein Gefäßlumen auszubilden. Hierzu adhären die Zellen aneinander und bilden einen kontinuierlichen oder fenestrierten Endothelzellmonolayer, der das Lumen umgibt. Um das neue Gefäß zu stabilisieren, sezernieren die Endothelzellen neue extrazelluläre Matrix, und werden wieder von Perizyten und Muskelzellen umgeben (62).

Zahlreiche Faktoren regulieren dabei in einem Zusammenspiel die Angiogenese. Eine Änderung des Gleichgewichts zwischen Stimulatoren und Inhibitoren zugunsten der Stimulatoren, führt zu einer Aktivierung des sogenannten „angiogenic switch“ und damit zur Angiogenese (79). Einer der wichtigsten angiogenetischen Faktoren, der an der Gefäßneubildung beteiligt ist, ist der Vaskulo-Endotheliale-Wachstumsfaktor oder Vasculo-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) (s.u.).

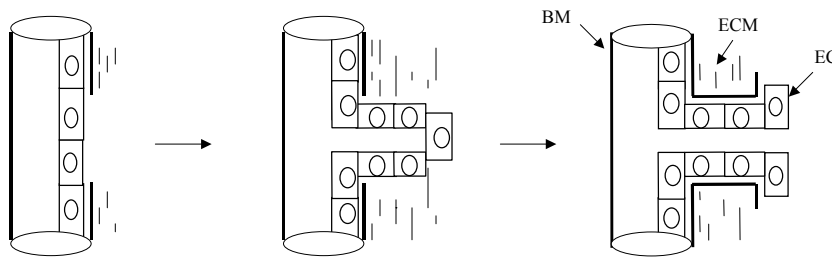


Abb. 2: Schema der Angiogenese durch Sprouting:

Zur Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden (Angiogenese) kommt es nach dem Abbau der Basalmembran und extrazellulären Matrix durch Proliferation und Migration der Endothelzellen und anschließenden Ausbildung neuer Kapillaren, die wieder von Perizyten und Muskelzellen umgeben sind.

ECM: extrazelluläre Matrix, BM: Basalmembran, EC: Endothelzelle

1.3. Zytokine

Bei Zytokinen handelt es sich um eine uneinheitliche Gruppe löslicher Proteine und Peptide, von kurzer Halbwertszeit, die von den verschiedensten Zellarten gebildet und sezerniert werden. Zytokine dienen als interzelluläre Mediatoren zur Kommunikation der Zellen untereinander. Sie wirken normalerweise in nano- oder pikomolaren Konzentrationen und modulieren die Aktivität einzelner Zellen oder Gewebe (85, 172). Charakteristisch ist ein para- oder autokrines Verhalten (d.h. sie wirken auf die Zellen der unmittelbaren Umgebung oder die sezernierenden Zellen selbst), jedoch können sie auch systemisch wie endokrine Hormone agieren. Die Aktivität der Zielzellen wird koordiniert, indem die Zytokine an spezifische hochaffine Rezeptoren binden und einzelne oder ganze Kaskaden von zellspezifischen Aktionen auslösen.

Das Spektrum der Funktionen, die von Zytokinen koordiniert werden, ist sehr vielseitig. Ihre Wirkung wurde zuerst im Rahmen der Hämatopoese und des Immunsystems untersucht, wo sie drei grundlegende Zellaktivitäten regulieren: Wachstum, Differenzierung und Aktivierung. Ein weiterer Effekt ist die Chemotaxis. Die entsprechenden Zytokine werden zu einer eigenen Untergruppe, den Chemokinen, gezählt. Auch Apoptosis, der programmierte Zelltod, wird durch Zytokine eingeleitet und kontrolliert. Systemische Reaktionen wie Fieber, Septischer Schock, Akute-Phase-Reaktion sowie Wundheilungsprozesse können ebenfalls durch Zytokine vermittelt

werden (22, 51). Selbst psychische Stress-Situationen beantwortet der Körper mit einer Alteration in der Produktion regulatorischer Zytokine (120).

Angiogenetische Aktivität wurde insbesondere bei VEGF und auch bei IL-8, TNF- α , Angiopoetin 1 und 2 beschrieben (56, 65, 102, 197).

1.3.1. Das Zytokin Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF)

Einer der wichtigsten Überlebens- und Wachstumsfaktoren des Gefäßendothels ist VEGF, der Vaskulo-Endotheliale-Wachstumsfaktor, oder Vasculo-Endothelial-Growth-Factor, der 1989 isoliert und charakterisiert wurde (56, 74, 180). In der Embryonalperiode ist VEGF lebensnotwendig zur Entwicklung des kardio-vaskulären Systems (24, 54). Er führt zu einer Induktion der Gefäß-Neubildung, der Endothelzell-Proliferation und Migration und zu einer Inhibition der Apoptose. Dadurch spielt VEGF eine wichtige Rolle bei der Regulation und Koordinierung der Angiogenese (55). Außerdem führt VEGF auch zu einer Vasodilatation, z.B. durch die Stimulation der NO-Synthase in Endothelzellen (195).

Schließlich konnte gezeigt werden, dass der bereits 1983 entdeckte vaskuläre Permeabilitätsfaktor (VPF), der zu einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit führt, identisch mit dem Vaskulo-Endothelialen Wachstumsfaktor ist. Dieser scheint eine Rolle z.B. bei der bakteriellen Meningitis zu spielen (183). Es wurden noch weitere Wachstumsfaktoren entdeckt, die zur VEGF Familie gehören, wie z.B. PlGF (plazenta-growth-factor) und VEGF-B, -C, -D und -E. Ihre Funktion ist derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D: (89, 91, 159)).

Eine irreguläre VEGF-Expression trägt durch die vermehrte Gefäßbildung und damit Durchblutung zur Entwicklung von Tumoren bei. Auch für die Wundheilung (19) und viele andere Krankheiten, die durch eine abnorme Angiogenese gekennzeichnet sind, ist VEGF ein entscheidender Faktor (2). Für das Kaposi-Sarkom, das eine große morphologische Ähnlichkeit mit der bazillären Angiomatose besitzt, wurde die kausale Rolle von VEGF bereits nachgewiesen (121).

1.3.1.1. Isoformen

VEGF ist ein Heparin-bindendes Glykoprotein, das von verschiedenen Zellarten sezerniert wird. Es ist ein über eine Disulfidbrücke verbundenes Dimer mit einer Größe

von 36-46 kDa. Zum platelet-derived-growth-factor (PDGF) findet sich eine ca. 20 %ige Homologie (137).

Beim Menschen gibt es fünf Isoformen des VEGF, die durch alternatives splicing der mRNA aus demselben Gen entstehen (84, 180). Diese 5 Isoformen unterscheiden sich durch ihre Größe (121, 145, 165, 189 = VPF, 206 Aminosäuren) und durch ihre biologischen Eigenschaften. Wichtig ist dabei die Fähigkeit Heparin-Sulfat zu binden, da dies zu einer erhöhten Aktivität des Wachstumsfaktors führt. Der Isoform VEGF 121 fehlt diese Eigenschaft. VEGF 189 und 206 haben dagegen eine sehr viel höhere Affinität zu Heparin-Sulfat als VEGF 145 und 165 und werden deswegen nicht in das Medium sezerniert, sondern binden stattdessen an Heparin-Sulfat enthaltende Proteoglykane der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix (188). Die meisten Zellen produzieren verschiedene Varianten gleichzeitig, wobei VEGF 121 und 165 die vorherrschenden Isoformen sind (130).

1.3.1.2. Regulation der VEGF-Produktion

VEGF spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Angiogenese. Deswegen wird seine Expression durch sehr viele verschiedene externe Faktoren beeinflusst. Die wichtigsten Einflussfaktoren auf die VEGF-Expression sind Hypoxie, verschiedene Zytokine oder aktivierte Onkogene.

Hypoxie und Hypoglykämie sind die stärksten Stimulatoren der VEGF-Expression (165). Die Hypoxie-induzierte Transkription der VEGF-mRNA ist dabei abhängig von der Bindung eines Transkriptionsfaktors, des „hypoxia-inducible-factors-1“ (HIF-1) an eine HIF-1 Bindungsstelle auf dem VEGF-Promoter (114). Außerdem wurde beobachtet, dass nicht nur Sauerstoffmangel, sondern auch Onkogene (z.B. v-src) die Expression von HIF-1 induzieren kann (88).

Zu den Zytokinen, die die VEGF-Produktion stimulieren, gehören z. B. der Fibroblast-growth-factor-4 (FGF-4) (42), platelet-derived-growth-factor (PDGF) (57), und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) (153).

Die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen, wie z. B. p53- (184), oder dem von Hippel-Lindau (vHL)-Gen (117), sind weitere Mechanismen, die zu einer Überexpression von VEGF führen.

1.3.1.3. Rezeptoren

Kurz nach der Entdeckung des vaskulo-endothelialen Wachstumsfaktors wurden auch dessen Rezeptoren identifiziert (182). Diese Rezeptoren sind durch sieben Immunglobulin - artige Domänen in ihrem extrazellulären Anteil und einer Tyrosinkinase-spaltenden Domäne im intrazellulären Anteil charakterisiert und können deshalb als neue Untergruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren angesehen werden (44, 64, 179). Es gehören drei Rezeptoren zur Familie der VEGF-Rezeptoren (VEGF R1-3): VEGFR-1, auch Flt-1 (44), VEGFR-2, auch KDR oder Flk-1 (179) und VEGFR-3, auch Flt-4. Der letzte wird nur in Lymphgefäßen exprimiert und bindet VEGF-C und -D (92).

VEGFR-1 und VEGFR-2 werden vorwiegend auf Endothelzellen exprimiert, allerdings kommen sie auch noch auf einigen anderen Zelltypen (VEGFR-1: Trophoblastenzellen (28), Monozyten (8), renale Mesangiumszellen (176); VEGFR-2: hämatopoietische Stammzellen, Megakaryozyten, retinale Vorläuferzellen (95, 194)) und Tumorzellen, wie z.B. Malignen Melanom-Zellen (71) vor. Besonders der VEGF-Rezeptor-2 scheint wichtig für die Induktion der Endothelzellproliferation zu sein, wie durch die Herstellung von VEGF-Mutanten, die entweder an VEGFR-1 oder -2 binden können, gezeigt wurde (99).

Endothelzellen exprimieren außerdem noch Neuropilin-1 und Neuropilin-2, die als Co-Rezeptoren für VEGFR-2 fungieren und spezifisch für die Isoform VEGF 165 sind (169).

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

Das zur Gruppe der Interleukine gehörende Interleukin-8 ist ein klassisches Chemotaxin und ein Modulator des Immunsystems (94). Es wird unter anderem von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen sezerniert. Nach seiner Induktion durch den Tumor-Nekrose-Faktor oder Interleukin-1 wird IL-8 induziert und wirkt dann als chemotaktischer Faktor auf neutrophile Granulozyten, Monozyten, T- und B-Lymphozyten (6). Es dient als spezifischer Aktivator von neutrophilen Granulozyten und hat anti-inflammatorische Wirkung auf B-Zellen. Außerdem gehört IL-8 auch zu der Gruppe der vaskuloproliferativen Zytokine. Humanes rekombinantes IL-8 wirkt als proliferativer und chemotaktischer Stimulus auf HUVECs. Von Koch und

Polverini konnte in einem Ratten-Cornea-Modell nachgewiesen werden, dass IL-8 eine starke angiogenetische Aktivität aufweist (43, 100, 102, 196).

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von angioproliferativen Faktoren bei einer *Bartonella henselae* Infektion experimentell *in vitro* zu analysieren. Dazu wurde die VEGF und IL-8 Synthese verschiedener Zelltypen nach Infektion mit *B. henselae* mittels ELISA und RT-PCR untersucht.

Die Rolle der beteiligten bakteriellen Faktoren sollte durch die Verwendung von viablen, hitzegetöteten oder sonifizierten Bakterien und durch den Vergleich von Pili-positiven mit Pili-negativen Mutaten untersucht werden.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob durch *B. henselae* induzierter vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor zu einer Endothelzellproliferation *in vitro* führt. Die proliferative Wirkung auf Endothelzellen sollte dargestellt und der Anteil an VEGF, der zu dieser Wirkung beiträgt, bestimmt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag zum Verständnis der Entstehung der bakteriell induzierten Angiogenese bei Infektion mit *B. henselae* leisten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

| | |
|--|-----------------------------------|
| Analysenwaagen: Kern 510-63 | Kern, Albstadt |
| Brutschränke: Sanyo CO2-Inkubator MCO-17AI | Sanyo, Japan |
| Cytoperm 2 | Heraeus, Hanau |
| Eppendorfpipetten und Multistepper | Eppendorf, Hamburg |
| Gelelektrophorese: Power Pac 300 | BioRad, München |
| Konfokales Lasermikroskop: Leica TCS NT | Heerbrugge, Schweiz |
| Software: Adobe Photoshop 7,0 | Adobe, Mountain View, CA |
| Mikroskope: Axiovert 25 Plattenmikroskop | Zeiss, Jena |
| Tischmikroskop KF-2 | Zeiss, Jena |
| Neubauer-Zählkammer | Brand, Landshut |
| PCR-Thermacycler: GeneAmp PCR System 2400 / 9600 | PerkinElmer, Überlingen |
| pH-Meter: Modell pH 530 | WTW, Weilheim |
| Photometer: Ultrospec 3000 | Pharmacia, Freiburg |
| Photometer für ELISA: ELX 808 | Bio-Tek Instruments, Overath |
| ELISA Auswertungssoftware: MikroWin 3.0 | Mikrotek Laborsysteme, Overath |
| Pipetus standard | Hirschmann, Eberstadt |
| Quarzküvetten für Photometer: QS 1000 blue point | Hellma, Müllheim |
| Schüttelinkubator: Certomat BS-1 | B.Braun, Melsungen |
| Sonificator: Branson Cell Disruptor B15 | G.Heinemann, Schwäbisch Gmünd |
| Sterilwerkbank Hera Safe | Heraeus, Hanau |
| Szintillationszähler: 1450 Microbeta Trilux | Wallac, Turku, Finnland |
| Tischinkubator: TR-L288 | Libisch, Bielefeld |
| Vortexer: Reax 2000 | Heidolph, Kelheim |

Zentrifugen:

| | |
|-----------------|--------------------|
| Megafuge 1.0 | Heraeus, Hanau |
| Megafuge 3.0 | Heraeus, Hanau |
| Omnifuge 2.0 RS | Heraeus, Hanau |
| Sigma 3K30 | B.Braun, Melsungen |
| Eppendorf 5417R | Eppendorf, Hamburg |

2.1.2. Sonstige Materialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Nunc, Roskilde, Dänemark; Sartorius, Göttingen; Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg; B. Braun, Melsungen; Eppendorf, Hamburg; Schleicher & Schuell, Kassel; Greiner, Nürtingen.

Zubehör für 1450 Mikobeta:

| | |
|---|-------------------------|
| Filtermatten, Plastiktüten, Szintillationsflüssigkeit | Wallac, Turku, Finnland |
|---|-------------------------|

2.1.3. Chemikalien

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien von der Firma E. Merck, Darmstadt, Feinchemikalien von der Firma Sigma, Deisenhofen, Medien und Zusätze für die Zellkultur von der Firma Biochrom, Berlin und Medien für die Bakterienkultur von der Firma Difco, Detroit, MI, USA bezogen.

| | |
|--|----------------------------------|
| Click/RPMI, fetales Kälberserum (FKS), PBS, | |
| Natriumpyruvat, nicht essentielle Aminosäuren | Biochrom, Berlin |
| Endothelzell-Medium, smooth-muscle-cell-Medium | PromoCell, Heidelberg |
| Hepes, L-Glutamin | Gibco BRL, Berlin |
| Kollagen III (3g/l) | Biochrom, Berlin |
| Substanz A (Streptavidin) | Dako, Neuss |
| Substanz B (Biotin-alkalische Phosphatase) | Dako, Neuss |
| DEPC (Diethyl-Pyrocyanat) | Sigma, Deisenhofen |
| dNTP (dTTP, dGTP, dCTP, dATP) | Boehringer Mannheim, Mannheim |

| | |
|--|----------------------------------|
| MgCl ₂ 25 mM | Boehringer Mannheim, Mannheim |
| TRIzol Total RNA Isolation Reagent | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Trypan-Blau | Sigma, Deisenhofen |
| Phalloidin, konjugiert mit Fluorescein-isocyanat (FITC) oder mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) | Sigma, Deisenhofen |
| Cycloheximid | |
| Cytochalasin-D | |
| Triton-X-100 | |

2.1.4. Antibiotika

| | |
|--------------|------------------|
| Penicillin | Biochrom, Berlin |
| Streptomycin | Biochrom, Berlin |
| Gentamicin | Biochrom, Berlin |

2.1.5. Radioaktivität

| | |
|---|-------------------------------------|
| Methyl-[³ H]-Thymidin, 1 mCi/ml | ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA |
|---|-------------------------------------|

2.1.6. Proteine und Enzyme

Proteine und Enzyme lieferten: Biomol (Hamburg), Böhringer (Mannheim), Sigma (Deisenhofen), Gibco BRL, Life Technologies (Berlin), United States Biochemical Corp. (Cleveland, Ohio, USA) und Pharmacia (Uppsala, S).

| | |
|---|--------------------------|
| BSA | Biomol, Hamburg |
| RNAsin, 40 U/μl | Promega, Madison, USA |
| Reverse Transkriptase: SuperScript II Tnase H ⁻ , 200 U/μl | Gibco BRL, Karlsruhe |
| Taq DNA-Polymerase: Ampli-Taq, 5 U/μl | Perkin Elmer, Überlingen |

2.1.7. Rekombinante Zytokine

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| rekombinantes humanes IL-8 | Pharmingen, San Diego, CA, USA |
| rekombinantes humanes VEGF | R&D Systems, Wiesbaden |
| rekombinanter humaner TNF- α | R&D Systems, Wiesbaden |

2.1.8. Antikörper

| | |
|---|------------------------|
| anti-humanes VEGF Antikörper | R&D Systems, Wiesbaden |
| Primärantikörper (rabbit anti- <i>Bartonella henselae</i>) | (98) |
| Sekundärantikörper FITC (goat-anti-rabbit, konjugiert mit Fluorescein-isothiocyanat) | Dianova, Hamburg |
| Sekundärantikörper Cy-5 (goat-anti-rabbit FAB-Fragmente, konjugiert mit Cy-5) | Dianova, Hamburg |

2.1.9. Zelllinien**Tab. 2:** Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien.

| Zelllinie | Zelltypus | Organ | Herkunft/Quelle |
|------------------|----------------------------|--|-----------------------------|
| EA.hy 926 | Epithel- /Endothelzelle | Lungen-Karzinom fusioniert mit Gefäßendothel | (50) |
| HUVEC | Endothelzelle | Nabelschnur | (98), diese Arbeit |
| CRL-1999 | Glatte Muskelzelle | Glatte Aortenmuskulatur | ATCC, Rockville, MD, USA |
| Hela 229 | Epithelzelle | Zervix-Karzinom | ATCC, Rockville, MD, USA |

2.1.10. Bakterienstämme

| | |
|--|--------------|
| <i>Bartonella henselae</i> Marseille | (46) |
| <i>Bartonella henselae</i> | |
| Pilus-negative Spontanvariante (Pil ⁻) | diese Arbeit |
| <i>Escherichia coli</i> HB 101 | (162) |
| <i>Escherichia coli</i> HB 101 (pInv1914) | (162) |
| <i>Listeria monocytogenes</i> EGD 1/2a | (5) |

2.1.11. Medien

Die Medien für Zellkultur wurden steril angesetzt und bei +4°C gelagert. Das FKS wurde vor Benutzung 30 min bei 60°C im Wasserbad inaktiviert.

Tab. 3: Übersicht über die in der Zellkultur eingesetzten Medien

| | |
|---|---|
| Zellkulturmedium (supplementiertes Click/RPMI) | 11,34 g Click/RPMI 1640 10 ⁵ E Penicillin und 10 mg Streptomycin 10 mM HEPES Natrium-Bicarbonat 7,5% 5x 10 ⁵ M (0,5 mM) b-Mercaptoethanol 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1/100 VT nicht essentielle Aminosäuren (100 x) in 1 l A. bidest. lösen, pH 7,2-7,4 mit NaHCO ₃ |
| Einfriermedium für Zellen | 10% DMSO 50% FKS in Click/RPMI 1640 |
| Assay-Medium M-199 | Biochrom, Berlin |
| Smooth muscle cell medium | PromoCell, Heidelberg |
| Endothelial Cell Basal/Growth Medium | PromoCell, Heidelberg; Growth Medium enthält zusätzlich: 0,4% ECGS/H 2% FKS 0,1 ng/ml Epidermalen Wachstumsfaktor 1 µg/ml Hydrocortison 1 ng/ml Fibroblastenfaktor 50 ng/ml Amphotericin B 50 µg/ml Gentamicin |

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

| | |
|------------------------------|---|
| LB (Luria-Bertani)-Medium | 5 g NaCl 5 g Bacto Hefeextrakt 10 g Bacto Trypton in 1 l A. bidest. lösen, pH 7,4-7,6 mit NaOH |
| Einfriermedium für Bakterien | 20% Glycerol; Merck, in LB-Medium |

2.1.12. Zellbiologisch wirksame Substanzen

| | |
|--|---|
| Endotoxin (= LPS, von <i>Escherichia coli</i> 055:B5) | Bacto Lipopolysaccharides, Difco, Detroit, MI, USA |
| IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid, Stocklösung in <i>A. bidest.</i>) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| PMA (Phorbol-12 Myristate-13-Acetat, Stocklösung in DMSO) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

2.1.13. Synthetische Oligonukleotide

Für die Reverse Transkription wurde Oligo-d(T)₁₂₋₁₈-Primer (Stock: 0,5 μ g/ μ l) von der Firma Gibco BRL, Karlsruhe, bezogen.

Die für die PCR verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion, Martinsried synthetisiert.

Tab. 5: Oligonukleotid-Primerpaare und Größen der PCR-Produkte für die untersuchten Zytokine, Rezeptore, sowie β -Actin

| mRNA-Art | 5' - Primer | 3' - Primer | Größe des PCR-Produktes (bp) | Zitat |
|-----------------------------------|---|---|------------------------------|-------|
| VEGF I | 5'-TCCAGGAGTACC CTGATGAG-3' | 5'-ATTCACATTTGTT GTGCTGT-3' | 204 | (128) |
| VEGF II | 5'-CGAAGTGGTGAAG TTCATGGATG-3' | 5'-TTCTGTATCAGTC TTTCCTGGTGAG-3' | 403, 600 | (128) |
| Flt-1 (VEGF-Rezeptor1) | 5'-GAGAATTCACTAT GGAAGATCTGATTTC TTACAGT-3' | 5'-GAGCATGCGGTA TAAATACACAT-3' | 1098 | (175) |
| KDR | 5'-TATAGATGGTGT AACCCGGA-3' | 5'-TTTGTCACTGAG ACAGCTTGG-3' | 555 | (175) |
| β-Aktin | 5'-TGACGGGGTCAC CCACACTGTGCC CATCTA-3' | 5'-CTAGAAGCATTG CGGTGGACGATG GAGGG-3' | 661 | (90) |

Als Elektrophoresemarker für die resultierenden PCR-Produkte wurde eine 100 bp-Leiter für den Bereich 100–1500 bp (DNA Molecular Weight Marker XIV von Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) verwendet.

2.1.14. Puffer und Lösungen für Agarosegel-Elektrophorese

Tab. 6: Übersicht über die für die Agarosegel-Elektrophorese eingesetzten Puffer und Lösungen

| | |
|---------------------------------------|--|
| 10x TAE-Puffer | 0,4 M Tris-HCl (Gibco BRL) 50 mM Natriumacetat (E. Merck) 10 mM EDTA (E. Merck), pH 7,6 |
| 10x Probenpuffer (PCR-loading buffer) | 0,25% (w/v) Bromphenolblau (Sigma) 25% (v/v) Ficoll 400 (Biomol) |
| Ethidiumbromid-Lösung | 10 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma) in A. bidest. |
| 10x Tris PCR-Puffer pH 8,3 | GeneAmp 10x PCR Buffer; Perkin-Elmer |
| RT 5x-Puffer | 5x First Strand Buffer, Gibco BRL (250 mM Tris-HCl, pH8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂) |
| DTT 0,1 M | Gibco BRL |

2.1.15. ELISA

2.1.15.1. VEGF-ELISA

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

2.1.15.2. IL-8-ELISA

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

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

2.2. Methoden

2.2.1. Bakterien

2.2.1.1. Bakterienherstellung für *in vitro* Infektionen

Für die Infektionsexperimente wurde *Bartonella henselae* Marseille (46) benutzt. Die Bakterien wurden auf Columbia-Agar-Platten mit 5% Schafsblut ausgestrichen und bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Nach 5 Tagen wurden sie mit Wattestäbchen in Luria-Bertoni (LB)-Medium geerntet, mit LB-Medium gewaschen und in Einfriermedium (LB-Medium + 20% Glycerin) resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle der Bakterienanzahl wurden serielle Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension auf Blutagar ausgeplattet und nach 5 Tagen ausgezählt.

Zu Infektionsversuchen wurden die Bakterien aufgetaut, mit dem entsprechenden Medium gewaschen und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

2.2.1.2. Herstellung von hitzegetöteten Bakterien für *in vitro* Untersuchungen

Zur Herstellung hitzegetöteter Bakterien wurden Bakterien aufgetaut und in sterilem PBS gewaschen. Danach wurden die Bakterien für 1h bei 60°C im Tischinkubator inaktiviert. Bis zu ihrem Gebrauch wurden die hitzegetöteten Bakterien bei + 4°C aufbewahrt. Zur Sterilkontrolle wurde die Bakteriensuspension auf Blut-Agar-Platten ausgestrichen und über mindestens vier Wochen bebrütet, um sicher zu stellen, dass alle Bakterien abgetötet wurden.

2.2.1.3 Herstellung von sonifizierten Bakterien für *in vitro* Untersuchungen

Bartonella henselae wurde auf Blut-Agar-Platten ausgestrichen, nach 5 Tagen geerntet und im entsprechenden Zellkultur-Medium aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde auf Eis fünf mal für 30 Sekunden sonifiziert, aliquotiert und anschließend bei - 20 °C weggefroren. Zur Überprüfung der Sterilität wurden hier ebenso wie bei den hitzegetöteten Bakterien Sterilkontrollen auf Columbia-Agar angelegt und über vier Wochen bebrütet.

2.2.1.4. Herstellung Pilus-negativer *Bartonella henselae*-Spontanvarianten

Pilus-positive *Bartonella henselae* (Wildtyp) wurden auf Blut-Agar-Platten ausgestrichen (Passage 0), zwei Wochen inkubiert, bis Kolonien sichtbar waren, mit einem Wattestäbchen in PBS resuspendiert und erneut ausgestrichen. Die Bartonellen wurden über 35 Passagen kultiviert, bis sie ihre Fähigkeit zur Expression von Pili verloren hatten. Der Verlust der Pili wurde durch Elektronenmikroskopie überprüft (10, 98).

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Wachstumsbedingungen und Zellkulturtechniken

Für die Zellkulturversuche wurden verschiedene Endothel- (HUVEC), Epithel- (Hela 229) und Mesothelzelllinien (CRL), sowie Fusionszelllinien (EA.hy 926) verwendet.

Soweit nicht gesondert erwähnt, wurden Kultivierung und *in vitro* Zellkulturexperimente in den entsprechenden Medien bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Nach dem Adhärenzieren der Zellen am Flaschenboden aus Polystyren (Nunc, Roskilde, Dänemark) entstand ca. innerhalb einer Woche ein konfluenter Monolayer. Um die Zellen auf neue Flaschen aufzuteilen, wurde zur Komplexbildung der für die Adhäsion der Zellen an Oberflächen notwendigen Ca²⁺-Ionen der Monolayer kurz mit 5 ml 1 %-iger EDTA-Lösung überspült. Durch Inkubation in 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei Raumtemperatur werden Adhäsionsproteine der Zelloberfläche gespalten bzw. deaktiviert, wonach sich die Zellen leicht vom Flaschenboden lösen. Das Trypsin-EDTA wurde durch Zugabe von 8 ml Medium inaktiviert und je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:5 auf neue Flaschen aufgeteilt.

Da Endothelzellen (HUVEC) nur schlecht an den Polystyren-Flaschenboden adhären, wurden die Flaschen für Experimente mit HUVEC vorher mit Kollagen beschichtet. Hierfür wurde der Flaschenboden mit ca. 5 ml Kollagen III (3g/l) bedeckt und für einige Stunden stehen gelassen. Anschließend wurde das Kollagen wieder abgesaugt und die Flaschen bei -4°C aufbewahrt.

2.2.2.2. Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden aus den Kulturschalen geerntet, abzentrifugiert und in einer Konzentration von 10^7 Zellen pro ml Einfriermedium (s. Tab. 8) aufgenommen und aliquotiert. Um ein langsames und schonendes Abkühlen der Zellen auf -80°C zu gewährleisten, wurden die Zellen in einem bei 4°C vorgekühlten und mit Isopropanol gefüllten Behälter direkt bei -80°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2.3. Infektionsexperimente

Die Infektionsexperimente zur Gewinnung von Überstand für Zytokin-ELISA wurden zur Vermeidung unspezifischer VEGF-Produktion in FKS-freiem und zur Kokultur mit Bakterien außerdem in Antibiotika-freiem Medium durchgeführt.

Tiefgefrorene Zellen wurden aufgetaut, in Zellkulturflaschen ausgesät und wachsen gelassen, bis sie ein konfluentes Stadium erreicht hatten.

Für die Infektionsexperimente wurden die Zellen am Tag vor der Infektion wie bereits beschrieben mit Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst, mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in dem entsprechenden Medium in 6 bzw. 24-well-plates ausgesät. Die 6-well-plates erhielten 5ml Zellsuspension pro well (= 1×10^6 Zellen) und die 24-well-plates 1ml (= 1×10^5 Zellen). Zwei Stunden vor Infektion wurde das Antibiotika-haltige Medium abgesaugt und durch Antibiotika-freies Medium ersetzt.

Bartonella henselae wurden aufgetaut, abzentrifugiert (6500 rpm, 4°C , 10 min) und in dem passenden Medium resuspendiert. Die Bakterien wurden auf verschiedene Konzentrationen (mittlere Infektionsdosis (MOI) 3, 30, 300, 600, 900) eingestellt und zu den Zellen gegeben. Die Infektion erfolgte durch Zentrifugieren (1800 rpm, RT, 5min) zur Verbesserung des Bakterien-Zell-Kontaktes. Als Negativkontrollen diente reines Medium und als Positivkontrolle wurde 25 ng/ml PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) (52), bzw. 250 ng/ml TNF- α hinzugefügt.

Bei den Kontrollexperimenten mit *Listeria monocytogenes*, hitzegetöteten oder sonifizierten *Bartonella henselae* wurde analog verfahren.

Nichtinvasive *E.coli* HB101 und *Yersinia enterocolitica-invasin-exprimierende E.coli* HB101(*p inv 1914*) wurden in LB-Medium über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurde diese Übernachtskultur 1:10 in LB-Medium verdünnt und für 2 Stunden weiter inkubiert. Die Invasin-Expression wurde mit IPTG (1 $\mu\text{l/ml}$) stimuliert. Zur

Bestimmung der genauen Bakterienkonzentration wurde die optische Dichte gemessen. Die beiden *E. coli*-Stämme wurden auf eine MOI von 300 eingestellt. Die MOI wurde durch seriellles Ausplatten kontrolliert.

LPS wurde in einer Konzentration von 10, 100 und 1000 ng/ml als weitere Kontrolle zu den Zellen hinzugefügt

2.2.2.4. Modulation der Infektionsexperimente

Die Infektion der EA.hy 926-Zellen mit *Bartonella henselae* wurde durch vorherige Inkubation der Zellen mit Cycloheximid (CHX) und Cytochalasin-D (Cy-D) moduliert, um danach zu messen, ob eine Veränderung der VEGF-Spiegel im Zellkulturüberstand stattfand. Hierfür wurden die Zellen ebenfalls am Tag vor der Infektion ausgesät und am folgenden Tag ein Medienwechsel durchgeführt. Das Medium wurde abgesaugt und durch Antibiotika-freies Medium ersetzt, das verschiedene Konzentrationen von CHX (2µg/ml, 20µg/ml, 200µg/ml)(41) oder Cy-D (50nM, 100nM, 150nM) (40) enthielt. Die darauffolgende Infektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.2.5. Adhärenz und Invasion von *Bartonella henselae* (Gentamycin-protection-assay)

Um die Menge an adhärenenten und intrazellulären Bakterien zu bestimmen, wurden EA.hy 926 Zellen wie oben beschrieben in einer 24-well-plate ausgesät und mit *Bartonella henselae* infiziert.

Zur Überprüfung der Adhärenz wurde nach 30 min der Zellkulturüberstand entfernt und die Zellen dreimal mit dem entsprechenden Antibiotika-freien Medium gewaschen, um freie Bakterien zu entfernen. Die Zellen wurden osmotisch lysiert, indem jedes well 4 min mit 900 µl Aqua bidest. bedeckt, anschließend 100µl 10x PBS hinzugegeben und mit einer Pipette gut resuspendiert wurde.

Zur Bestimmung der Anzahl intrazellulärer Bakterien wurden zwei Stunden nach Infektion 10µl Gentamycin/well hinzugefügt (Konzentration in Medium: 100µg/ml), um die extrazellulären Bakterien abzutöten. Nach diesen zwei Stunden wurden die Zellen ebenfalls lysiert, um die intrazellulären Bakterien freizusetzen. Nach der Lyse der Zellen wurde jeweils eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt (1:10 mit PBS) und die Suspensionen auf Blut-Agar-Platten ausgestrichen. Nach 7-10 Tagen konnten die Bakterienkolonien ausgezählt und die Bakterienmenge berechnet werden.

2.2.2.6. Gewinnung von Zellkulturüberständen

Die Zytokinproduktion verschiedener Zelllinien wurde aus Zellkulturüberständen nach bakterieller Stimulation mittels ELISA untersucht. Die Zellkulturüberstände wurden 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion abgenommen. Nach Zentrifugation (12000 rpm, 3min, 4°C), um Partikel zu entfernen, die den ELISA stören könnten, wurde der Überstand bis zu weiteren Untersuchungen bei -20°C gelagert.

2.2.3. Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen: ELISA

Zum Nachweis der Zytokine in Zellkulturüberständen wurden IL-8- oder VEGF-ELISA benutzt. Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) eignete sich durch seine hohe Sensitivität, um die geringen Mengen Zytokin-Protein (im Pikogramm-Bereich) im Zellkulturüberstand quantitativ nachzuweisen. Dabei reagiert das zu messende Zytokin in einer Antigen-Antikörper-Reaktion als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper (*capture antibody*), der an einer Mikrotiterplatte anhaftet. Ein hinzugegebener, enzymgekoppelter Sekundärantikörper (*detection antibody*) bindet ebenfalls an das Zytokin und katalysiert gleichzeitig eine Farbreaktion. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional der Zytokin-Konzentration und kann photometrisch bestimmt werden. Anhand einer Standardkurve mit rekombinanten Zytokinen (rh IL-8, Pharmingen und rh VEGF, R&D Systems) wurde die absolute Konzentration ermittelt.

2.2.3.1. VEGF-ELISA

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

Zuerst wurden 50 µl Verdünnungspuffer und dann 200 µl Standard und Zellkulturüberstand hinzugefügt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der ELISA für 2 Stunden mit 200 µl Konjugat inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal gewaschen. Zuletzt wurden 200 µl der Entwicklerlösung dazugegeben und nach einer ca. 20 minütigen Inkubationszeit wurde die Entwicklung mit 50 µl Stopplösung beendet. Die Zytokinkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 540 nm oder 570 nm im ELISA-Photometer bestimmt.

2.2.3.2. IL-8-ELISA

50 µl des entsprechenden monoklonalen Primärantikörpers in einer Konzentration von 3 µg/ml in 0,1 M Na₂HPO₄ (pH 9) wurden über Nacht bei 4°C an eine ELISA-Platte adsorbiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch viermaliges Waschen mit PBS/Tween entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit PBS/FKS für 2h bei Raumtemperatur blockiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Überstände in die einzelnen Näpfe verteilt. Als Referenz wurden verschiedene Konzentrationen von rekombinantem humanem IL-8 verdünnt in Kulturmedium eingesetzt. Die Reaktion der in den Kulturüberständen befindlichen Zytokine mit denen an der ELISA-Platte gebundenen Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde viermal gewaschen. Die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers (0,5 µg/ml) erfolgte mit einem Volumen von 100 µl für 1h bei Raumtemperatur. Nach erneutem viermaligen Waschen wurden je 50 µl Konjugat auf die einzelnen Näpfe verteilt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurde 50 µl Entwicklerlösung in die Näpfe pipettiert und nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei 37°C im Dunkeln wurde die Zytokinkonzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einer Referenzwellenlänge von 490 nm mit einem ELISA-Photometer bestimmt.

2.2.4. Bestimmung der VEGF-mRNA Transkripte

Um die zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle in Produktion befindlichen, bzw. aktivierten Zytokine zu bestimmen, wurde die Methode der Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) gewählt. Durch ihre hohe Sensitivität erlaubt sie eine genaue Auswertung des bei Zellkulturversuchen nur in geringer Quantität vorhandenen Untersuchungsmaterials.

Bei der Bildung von Proteinen in eukaryotischen Zellen spielen sich vereinfacht folgende Schritte ab:

Nach Aktivierung bestimmter Gene durch Transkriptionsfaktoren werden zunächst im Zellkern Kopien eines entsprechenden Gens in Form von RNA erstellt (= Transkription). Diese *messenger* RNA (mRNA) wird aus dem Kern ins Zytosol der Zelle transportiert, um dort als Matrize für die eigentliche Proteinproduktion zu dienen (= Translation). Je nach Anzahl der gebildeten mRNA-Moleküle wird später eine unterschiedliche Menge des Proteins, z.B. eines bestimmten Zytokins, gebildet. Die RT-

PCR detektiert die Menge der zu einem Zeitpunkt in der Zelle kursierenden mRNA-Moleküle für ein bestimmtes Protein. Somit lässt sich der Aktivierungszustand der Zelle auf dem Niveau der mRNA, also der Transkription, festhalten und bestimmen.

Die im folgenden beschriebenen Schritte sind notwendig, um die mRNA und damit den Aktivierungsgrad der Zellen bezüglich eines Proteins darzustellen:

1. Isolierung der Gesamt-RNA
2. Bestimmung der im folgenden einzusetzenden RNA-Menge durch OD-Messung
3. Reverse Transkription der RNA in cDNA, da nur DNA, nicht aber RNA mittels PCR detektiert werden kann
4. Detektierung der cDNA durch Vervielfältigung mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)
5. Visualisierung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

2.2.4.1. Isolierung der Gesamt-RNA

Nach der Entfernung des Überstandes aus den wells wurden die Zellen zweimal mit dem entsprechenden Medium gewaschen. Anschließend wurde 1 ml TRIzol-Reagenz (Gibco BRL, Karlsruhe) zu jedem well gegeben, und die Zellen und TRIzol mit Hilfe einer Pipette homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension in Reaktionsgefäße überführt und nach Zugabe von 200 µl reinem Chloroform gevortext, bis eine homogene, weißliche Emulsion entstand.

Durch 15-minütiges Zentrifugieren (11000 rpm, 4°C) wurde die RNA von den Proteinen und der DNA getrennt. Proteine und DNA sammeln sich unten in der Interphase und organischen Phase, während sich die RNA oben in der wässrigen Phase befindet und mit einer 100 µl-Pipette vorsichtig abnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen läßt (insgesamt ca. 500 µl).

Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde wiederum gut gemischt, jedoch nicht gevortext. Die RNA-Extraktion kann hier unterbrochen werden und die bisher gewonnene RNA-Chloroform-Isopropanol-Suspension (ca. 1000 µl) bei -20 °C über mehrere Tage konserviert werden.

Nachdem die Suspension für 10 Minuten zentrifugiert wurde (11000 rpm, 4°C), wird die RNA als kleines Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar.

Der Überstand wurde nun abgekippt und der Flüssigkeitsrest nach kurzem abzentrifugieren mit einer 200µl-Pipette abgesaugt.

Das Pellet wurde mit 200 µl Ethanol (75 %) durch mehrmaliges resuspendieren mit einer Pipette gewaschen und wieder abzentrifugiert (10 min, 7500 rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgekippt, das Reaktionsgefäß kurz abzentrifugiert und mit einer 200µl-Pipette bestehende Flüssigkeitsreste abgesaugt.

Zuletzt wurde das Pellet in 20 µl H₂O+DEPC (mit DEPC behandeltes, Ribonuklease-freies steriles A. bidest.) durch 10 min Erwärmen bei 55-60°C aufgelöst, kurz abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C konserviert.

2.2.4.2. Maßnahmen im Umgang mit RNA

Da RNA ohnehin schon sehr viel instabiler ist als DNA und zusätzlich noch den ubiquitären RNasen ausgesetzt ist, ist besondere Sorgfalt im Umgang mit RNA notwendig.

Das in weiteren Schritten verwendete Wasser, das mit RNA in Berührung kam, wurde zuvor mit DEPC (Diethyl-Pyrocbonat) behandelt (im folgenden als „H₂O-DEPC“ bezeichnet), um RNasen zu inaktivieren. Zu einer frisch autoklavierten Flasche A. bidest. wurde DEPC zugegeben, um eine Konzentration von 0,01 % zu erhalten. Nach 12 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Flasche erneut autoklaviert, um verbleibendes DEPC zu entfernen.

2.2.4.3. Bestimmung der RNA-Menge über die Optische Dichte

Da die isolierte Gesamt-RNA-Menge abhängig von der ursprünglichen Zellzahl in der Probe und der Sorgfalt der RNA-Präparation variiert, muss für jede Probe individuell der RNA-Gehalt bestimmt werden, um für das weitere Vorgehen von jeder Probe identische RNA-Mengen zu verwenden.

RNA kann bei 260 nm photometrisch quantifiziert werden, da eine RNA-Lösung mit einer optischen Dichte (OD) von 1,0 eine Konzentration von 40 µg/ml besitzt. Verwendet wurden Quarzküvetten mit 10 mm Schichtdicke. Das Photometer wurde zunächst mittels einer mit reinem H₂O-DEPC gefüllten Küvette auf einen Null-Wert kalibriert. Für unsere Verhältnisse eignete sich eine Verdünnung der Gesamt-RNA-Proben von 1:100 in H₂O-DEPC, um genaue Werte bei der RNA-Quantifizierung zu erhalten (1 µl Proben-Aliquot auf 99 µl H₂O-DEPC). Der RNA-Gehalt der Probe errechnete sich wie folgt:

Gemessener OD-Wert bei 260 nm · Verdünnungsfaktor 100 · 40 µg/ml

Das Verhältnis aus den Absorptionswerten bei 260 nm und bei 280 nm (absorbance ratio) liefert eine Aussage über die Reinheit der RNA-Lösung und somit über die Qualität der Präparation der Gesamt-RNA. Der theoretisch optimale Wert ist 2,0; hier wurden Werte im Bereich von 1,5 - 1,8 erreicht. Bei Werten außerhalb dieses Bereichs wurde die Probe verworfen, bei Werten im Grenzbereich wurde in Kauf genommen, dass diese entsprechend geringere RNA-Mengen enthielten.

Für die eigentliche RT-PCR wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Anhand des so bestimmten RNA-Gehalts wurde für jede Probe mittels Dreisatz die einzusetzende Menge in µl errechnet.

Ein geringerer Reinheitsgrad der extrahierten RNA (z.B. bei einer geringeren Zellzahl der Probe) führt zur Verringerung der eingesetzten RNA-Menge, was sich in einer geringeren Zytokin-Banden-Intensität in der RT-PCR bemerkbar macht. Daher wurde in jedem Versuch neben den Zytokin-RT-PCRs auch eine RT-PCR für β -Actin, ein in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiertes Gen, durchgeführt. Eine unerwartet schwache Zytokin-Bande musste relativiert werden, wenn deren zugehörige β -Actin-Bande ebenfalls schwach war – oder umgekehrt. Bei großen Unterschieden zwischen den β -Actin-Banden wurde der Versuch wiederholt.

2.2.4.4. Reverse Transkription

Durch die Reverse Transkription wird von sämtlichen mRNA-Strängen der Probe mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* eine Kopie in DNA erstellt. Erst diese cDNA (copy DNA) kann mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) detektiert werden. (RNA lässt sich durch die PCR nicht vervielfältigen).

mRNA-Stränge unterscheiden sich von anderen RNA-Formen (rRNA der Ribosomen, tRNA = Transfer-RNA zur Übertragung von Aminosäuren) durch ein Ende mit mehreren Adenin-Basen (Poly-A-Sequenz). So lässt sich die mRNA spezifisch markieren, indem man DNA-Stränge aus Thymidin-Basen (Oligo-dT) den Proben hinzugibt: sie lagern sich aufgrund der spezifischen Basenpaarung nach Watson & Crick als Primer an die Poly-A-Sequenz an (Primer-Annealing). Hier kann dann das Enzym *Reverse Transkriptase* ansetzen, um den Strang komplett in DNA zu übersetzen.

Folgende Schritte wurden im einzelnen durchgeführt (14):

Primer-Annealing:

1. Errechnete Gesamt-RNA-Menge von 5 µg in ein Reaktionsgefäß vorlegen
2. Zugabe von 1 µl Oligo-dT (entspricht 500 ng) + einer entsprechenden Menge H₂O-DEPC, so dass ein Gesamtvolumen von 10 µl entsteht
3. Inkubation 10 min bei 65 °C

Reverse Transkription:

4. Zugabe der für die Reverse Transkription nötigen Reagenzien (insgesamt 11 µl):

| | | |
|-----------------------|---------|--|
| RT 5x-Puffer | 5,0 µl | |
| RNAsin | 1,0 µl | (entspricht 40 Units) |
| DTT 0,1 M | 2,0 µl | |
| Nukleotid-Mix | 2,0 µl | (entspricht 200 mM Endkonzentration je dATP, dCTP, dGTP, dTTP) |
| Reverse Transkriptase | 1,0 µl | (entspricht 200 U) |
| | 11,0 µl | |

5. Inkubation 60 min bei 37 °C
6. Inaktivierung: Inkubation 5 min bei 90 °C

Die erhaltene cDNA wurde 1:10 mit DEPC-H₂O verdünnt (+180 µl DEPC-H₂O) und bei -20° C aufbewahrt. Im Gegensatz zur RNA ist sie wesentlich stabiler.

2.2.4.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Einzelne Stränge der gewonnenen cDNA lassen sich nun selektiv mittels PCR exponentiell vervielfältigen (amplifizieren), um sie dann durch einen fluoreszierenden Farbstoff sichtbar zu machen und zu quantifizieren.

Durch spezifische Primer werden selektiv nur cDNA-Stränge der gewünschten Sequenz (z.B. für das Zytokin VEGF) markiert. Hier setzt das Enzym *Polymerase* an: pro PCR-Zyklus erstellt es eine Kopie von jedem markierten cDNA-Strang, so dass bei anfänglichen n cDNA-Strängen nach z.B. 25 Zyklen theoretisch n^{24} Kopien vorliegen.

Zur Durchführung der PCR wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Vorlegen von 5 μl (entspricht 5 μg) cDNA in die PCR-Reagenz-Tubes
2. Zugabe einer Mischung aus folgende Reagenzien (insgesamt 45 μl)

| | | |
|-----------------------------|--------------------|--|
| H ₂ O-DEPC | 25,1 μl | |
| 10x-Tris PCR Puffer (10 mM) | 5,0 μl | |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1,0 μl | (entspricht 2,5 mM Endkonzentration) |
| Nukleotid-Mix | 1,0 μl | (entspricht 200 mM Endkonzentration je dATP, dCTP, dGTP, dTTP) |
| Primer-Mix | 12,5 μl | (entspricht 25 pmol jedes 5' und 3' Primers) |
| DNA Polymerase | 0,4 μl | (entspricht 2 U) |
| | 45,0 μl | |

Primer: Die Primersequenzen wurden den Veröffentlichungen von K. Morii (128) und H. Suzuki (175) entnommen (siehe oben). Der Primer-Mix bestand aus jeweils 2 μM des 5' und 3' Primers. Nukleotide: Der Nukleotide-Mix bestand aus jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Die PCR-Temperaturprofile wurden verwendet wie für VEGF (76) und für die VEGF-Rezeptoren (175) beschrieben. (siehe Tab. 5)

Tab. 8: PCR-Temperaturprofile und Anzahl der PCR-Zyklen

| | β -Actin | VEGF | VEGF-Rezeptoren |
|--|----------------------------|---|---|
| 1. hot start | | 94°C, 5min | cold start |
| 2. Denaturierung | 95°C, 1 min | 94°C, 45 s | 94°C, 30 s |
| 3. Primer Annealing und Extension | 72°C, 2,5 min 22 Zyklen | 60°C, 1 min 72°C, 1 min 35 Zyklen | 60°C, 1 min 68°C, 2 min 32 Zyklen |
| 4. Ende | 72°C, 10 min | 72°C, 5 min | 68°C, 7 min |

Bei 4°C konnte das PCR-Produkt über Nacht aufbewahrt oder bei -20°C für längere Zeit konserviert werden.

2.2.4.6. Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt und durch einen fluoreszierenden Farbstoff unter UV-Licht als Banden sichtbar gemacht. Der Vergleich der einzelnen Zytokin-Banden untereinander erlaubt eine zuverlässige

qualitative Aussage über die Zytokin-Aktivität der Zelle zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion.

Zur Herstellung des 2%-igen Gels wurden 3 g Agarosepulver in 150 ml 1:10 verdünntem 10x TAE-Puffer zum Kochen gebracht, um die Agarose vollständig zu lösen. Nach Abkühlung auf etwa 60° C wurden 5 µl Ethidium-Bromid-Lösung hinzugegeben und das Gel in eine passende Form gegossen.

Für die Elektrophorese wurden jeweils 45 µl PCR-Produkt mit 5 µl 10x Probenpuffer (loading buffer zum Markieren der PCR-Produkte) in einen Gelschlitz gegeben und 45-90 min einer Spannung von 80 V ausgesetzt. Zur Kontrolle der Größe der PCR-Produkte wurden 2 µl einer 100 bp-Leiter für den Bereich zwischen 100–1500 bp als Marker an den Anfang jeder Gelzeile auftragen.

Die Gele wurden mit einer Videokamera unter UV-Licht digital abfotografiert und die Bilder zur weiteren Dokumentation auf dem Computer gespeichert.

2.2.5. VEGF-Proliferationsassays mit Endothelzellen

Um nachzuweisen, dass Endothelzellen durch VEGF, das nach *B. henselae* - Infektion von EA.hy 926 Zellen gebildet wurde, stimuliert werden, wurden HUVECs mit rekombinantem humanem VEGF als Kontrolle und dem VEGF-enthaltenden Überstand aus den Zellkulturexperimenten („konditioniertes Medium“) inkubiert. Der Einbau von [³H]-Thymidin in die replizierende DNA dient dabei als Parameter für die Endothelzell-Proliferation.

Zuerst wurde eine 96-well-Platte mit 50 µl Kollagenlösung pro well bedeckt und nach einer zweistündigen Inkubationszeit zweimal mit PBS gewaschen. HUVECs wurden mit Trypsin geerntet und in Assay-Medium auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Danach wurden 50 µl der Zellsuspension in jedes well pipettiert. 4 wells wurden zum Eichen des Szintillationszählers leergelassen. Als Standard wurden rekombinantes humanes VEGF (R&D Systems) in den Konzentrationen 0,0 ng; 0,1 ng; 1,0 ng und 10 ng VEGF /ml verwendet. Der VEGF-enthaltende Zellkulturüberstand wurde in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und mit 10, 20 und 40 µg/ml VEGF-neutralisierendem Antikörper (R&D Systems) versetzt hinzugefügt.

Der Versuchsansatz wurde über 48 Stunden inkubiert, bevor er für die letzten 24 Stunden mit 1 µCi [³H]-Thymidin versetzt wurden.

Anschließend wurden die Zellen bei -20°C eingefroren und mit einem Zellerntegerät (Harvester) auf eine Glas-Filtermatte geerntet, die in Plastiktüten mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit eingeschweißt wurde. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit Hilfe eines Szintillationszählers und wurde in cpm („counts per minute“) angegeben. Um Ergebnisse aus Proliferationsversuchen vergleichen zu können, wurde der Stimulations-Index (SI) aus dem Quotienten der Proliferationsrate stimulierter Zellen zur Proliferationsrate unstimulierter Zellen berechnet.

2.2.6. Doppelimmunfluoreszenz

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Infektionsverlaufes wurde eine Doppelimmunfluoreszenz (DIF) durchgeführt. Die intrazellulären Bakterien lassen sich dadurch blau darstellen, und so von den grün gefärbten extrazellulären Bakterien unterscheiden. Das Aktin-Skelett der Zellen wird rot gefärbt.

Für die DIF wurden Zellen in einer 24-well-plate auf kollagenisierte cover slips ausgesät und wie oben beschrieben infiziert. Nach 24 Stunden wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt und die Zellen mit 3,75%-igem Formalin fixiert.

Zu Beginn der Färbung und nach jedem Inkubationsschritt wurden die cover slips dreimal mit PBS gewaschen.

Zuerst wurden die fixierten Zellen 15 min mit 0,2 %-igem BSA in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Als nächstes wurde der Primärantikörper (rabbit anti-*B. henselae*) (Verdünnung 1:2000 in PBS) für 1 Stunde hinzugefügt, gefolgt von dem mit FITC konjugierten Sekundärantikörper (goat-anti-rabbit IgG) (Verdünnung 1:100 in PBS) für 1 Stunde. Hierdurch wurden die extrazellulären *Bartonellen* grün gefärbt.

Danach wurden die Zellen durch die 15 minütige Inkubation mit 0,1 %-igem Triton X-100 in PBS permeabilisiert, um das Aktin-Skelett und die intrazellulären Bakterien erreichen zu können.

Nach einem weiteren Blockierungsschritt mit 0,2 %-igem BSA für 15 min, wurden die Zellen 1 Stunde lang mit dem Primärantikörper zusammen mit dem mit TRITC konjugiertem Phalloidin (Verdünnung 1:1000), zur Anfärbung des Aktins inkubiert. Als letzter Inkubationsschritt wurde mit Cy-5 konjugierter Sekundärantikörper für eine Stunde hinzugegeben, und die intrazellulären *Bartonellen* damit blau gefärbt.

Zum Schluß wurden die getrockneten und mit Vectashield-Medium eingedeckelten cover slips mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht und die Bilder digital mittels Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet.

2.2.7. Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Es wurde jeweils eine Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Datenbewertung erfolgte über Signifikanztests. Zunächst wurde das Datenmaterial auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurde mittels F-Test auf Gleichheit der Standardabweichungen geprüft. Wenn mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von <5% kein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen nachweisbar war, wurde der Student t-Test zur Prüfung der Gleichheit der Mittelwerte durchgeführt. Die Differenz von Werten mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant beurteilt (200).

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis der VEGF Produktion in EA.hy 926, HUVEC, CRL-1999 und Hela 229 -Zellen nach *Bartonella henselae* - Infektion

Infektionen mit *B. henselae* können in Vaskuloproliferationen (BA, BP) resultieren. Es ist bekannt, dass dem vaskuloproliferativ wirkenden Zytokin VEGF eine Schlüsselrolle in der Neoangiogenese zukommt (194). Deswegen wurde untersucht, ob eine Infektion mit *B. henselae* mit einer Produktion von VEGF durch die infizierten Wirtszellen einhergeht.

Dazu wurden verschiedene Zelllinien mit *B. henselae* infiziert und VEGF im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

Es wurden im folgenden Endothelzellen (HUVEC), glatte Muskelzellen (CRL-1999) und Epithelzellen (Hela 229), bzw. Fusionszellen (Endothelzelle fusioniert mit Epithelzelle: EA.hy 926) verwendet, da auch Blutgefäße aus Endothel, Muskelzellen und umgebendem Epithel aufgebaut sind, und somit als mögliche VEGF-Produzenten am Entstehen der BA / BP beteiligt sein könnten.

3.1.1. Nachweis der VEGF Produktion mittels ELISA

Zur Untersuchung der VEGF Produktion wurden die Wirtszellen mit *B. henselae* infiziert und das in den Zellkulturüberstand sezernierte VEGF mittels ELISA detektiert. Die mittlere Infektionsdosis (MOI) lag bei 285 Bakterien pro Zelle, d. h. 100000 Zellen pro well wurden mit $2,85 \times 10^7$ Bakterien infiziert. Der Verlauf der Infektion der Zellen mit *B. henselae* wurde im Phasenkontrastmikroskop überprüft.

Als Positivkontrolle wurden 25 ng/ml PMA verwendet, das in den meisten Zelllinien zu einer starken VEGF-Induktion führt (76), die Negativkontrolle bestand aus dem entsprechenden Zellkulturmedium ohne weitere Zusätze. EA.hy 926-Zellen (Fusionszelllinien aus A 540-Epithelzellen und HUVEC) und Hela 229-Zellen (Cervix-Karzinom-Epithel) zeigten nach Stimulation mit *B. henselae* beide signifikant erhöhte VEGF-Spiegel. Zellkulturüberstände wurden nach 24, 72 und 120 Stunden abgenommen und der Anstieg der VEGF-Expression untersucht. Die höchsten Anstiege der VEGF-Produktion ergaben sich nach 72 Stunden.

Obwohl die Höhe der im ELISA gemessenen VEGF-Spiegel insgesamt während den einzelnen Versuchen variierte, lag der zwischen Negativkontrolle und infizierten Zellen

erreichte Anstieg immer bei einem Faktor von 3-8, in einigen Fällen wurde sogar die VEGF-Produktion der Positivkontrollen überschritten.

Um den Infektionsverlauf in diesen Experimenten zu kontrollieren, wurden mit *B. henselae* infizierte EA.hy 926 Zellen mittels Doppelimmunfluoreszenz mikroskopiert. Hierbei wurden intrazelluläre Bakterien, extrazelluläre Bakterien und das Aktinskelett der Zellen unterschiedlich angefärbt und im konfokalen Laserscanmikroskop analysiert. Es zeigt sich dabei, dass die im Zeitverlauf ansteigenden VEGF-Spiegel mit einem Anstieg der intrazellulären Bakterien korrelieren (Abb 3).

Tab. 9: VEGF-Produktion verschiedener Zelllinien nach Infektion mit *B. henselae*.

Messungen der VEGF-Spiegel im Zellkulturüberstand mittels ELISA; EA.hy 926-Zellen, Hela 229-Zellen, HUVECs und CRL-1999 wurden mit *B. henselae* (MOI 285) infiziert und der Zellkulturüberstand nach 1, 3 und 5 Tagen abgenommen; von CRL-1999 konnte wegen des langsamen Wachstums nur Werte nach einem Tag gemessen werden; die Kontrollen wurden nicht infiziert oder mit PMA (25 ng/ml) stimuliert; die Werte sind in pg/ml angegeben. <NWG = kleiner Nachweisgrenze

| | Kontrolle | <i>Bartonella henselae</i> | PMA (25 ng/ml) |
|------------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| EA.hy 926 (d+1) | 62,0 +/- 2,6 | 137,9 +/- 3,9 | 192,5 +/- 11,9 |
| EA.hy 926 (d+3) | 80,3 +/- 8,8 | 277,2 +/- 18,3 | 246,7 +/- 14,7 |
| EA.hy 926 (d+5) | 129,4 +/- 10,0 | 172,9 +/- 5,5 | 219,4 +/- 15,5 |
| Hela 229 (d+1) | 187,9 +/- 45,5 | 196,7 +/- 31,9 | 441,9 +/- 90,9 |
| Hela 229 (d+3) | 888,2 +/- 41,5 | 1461,3 +/- 140,9 | 1848,8 +/- 485,8 |
| HUVEC (d+1) | <NWG | <NWG | <NWG |
| HUVEC (d+3) | <NWG | <NWG | <NWG |
| HUVEC (d+5) | <NWG | <NWG | <NWG |
| CRL-1999 (d+1) | 770,8 +/- 48,4 | 866,8 +/- 113,9 | 1640,3 +/- 86,4 |

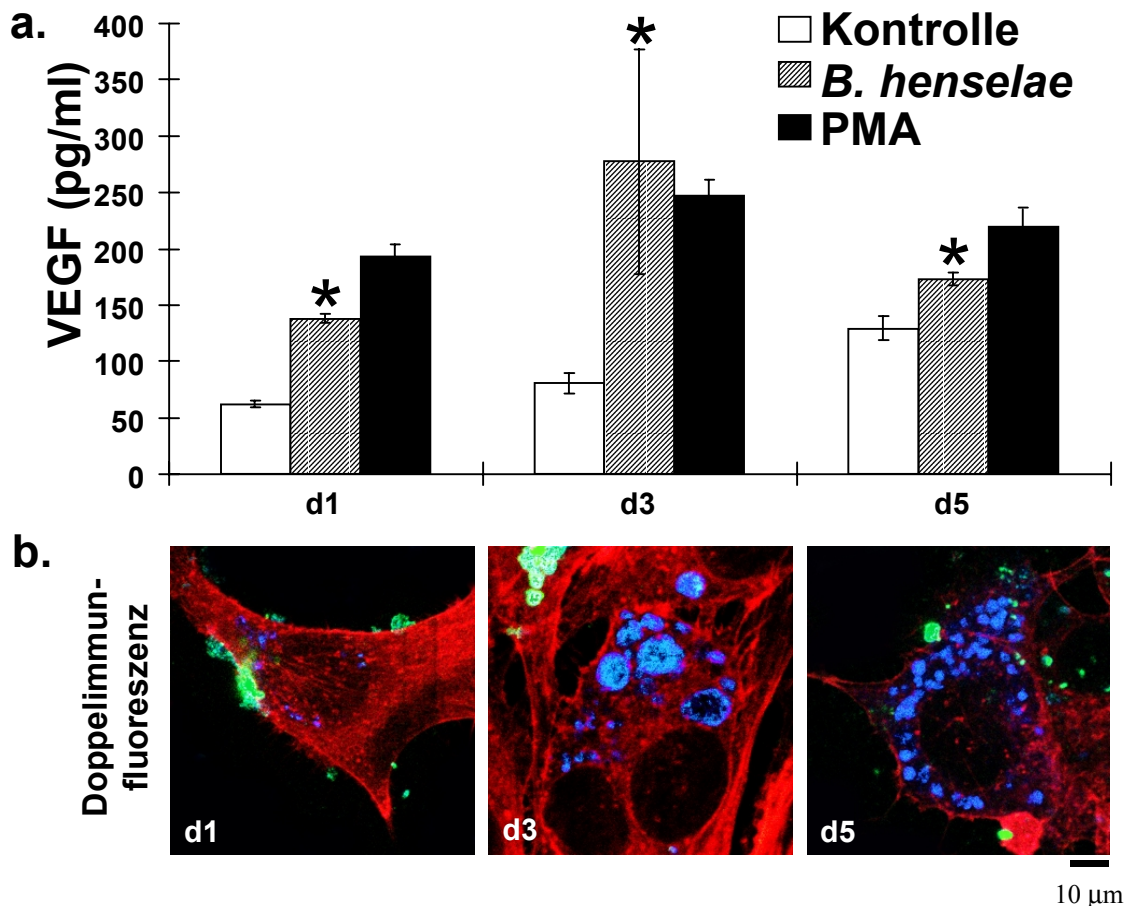


Abb. 3: VEGF-Produktion von EA.hy 926 Zellen nach Infektion mit *B. henselae*.

a. Messung der VEGF-Spiegel im Zellkulturüberstand nach 1, 3 und 5 Tagen mittels ELISA; EA.hy 926 Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 285) infiziert; die Kontrollen wurden nicht infiziert oder mit PMA (25 ng/ml) stimuliert.

b. Verlauf der Infektion von EA.hy 926 Zellen mit *B. henselae*, dargestellt durch Doppelimmunfluoreszenzfärbung und analysiert mittels konfokaler Laserscanmikroskopie: extrazelluläre Bakterien wurden mit FITC-konjugierten Sekundär-Antikörpern (grünes Signal) und intrazelluläre Bakterien mit Cy-5-konjugierten Sekundär-Antikörpern (blaues Signal) dargestellt; Aktinfilamente wurden mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (rot) angefärbt. Maßeinheit: 10 μ m

Im Gegensatz zu EA.hy 926- und Hela 229-Zellen kam es weder bei Endothelzellen (HUVEC), noch bei glatten Muskelzellen (CRL-1999) zu einem Anstieg der VEGF-Spiegel im Zellkulturüberstand nach Infektion mit *B. henselae*. Dabei konnte in HUVECs auch mit PMA keine VEGF-Synthese induziert werden (siehe Abb. 4). Bei den glatten Muskelzellen dagegen war ein Anstieg der VEGF-Spiegel nach Stimulation mit PMA zu verzeichnen, nicht jedoch nach Infektion mit *B. henselae* (siehe Abb. 5). Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass der Erreger *B. henselae* in der Lage ist, eine Erhöhung der VEGF-Synthese in einigen seiner Wirtszellen zu induzieren, wobei die Endothelzellen (HUVEC) selbst nicht zu einer VEGF-Produktion angeregt werden können. Des Weiteren lässt sich erkennen, dass mit zunehmendem Zeitverlauf die VEGF-Produktion ebenfalls ansteigt, allerdings nach Überschreiten einer Schwelle nicht mehr weiter zunimmt.

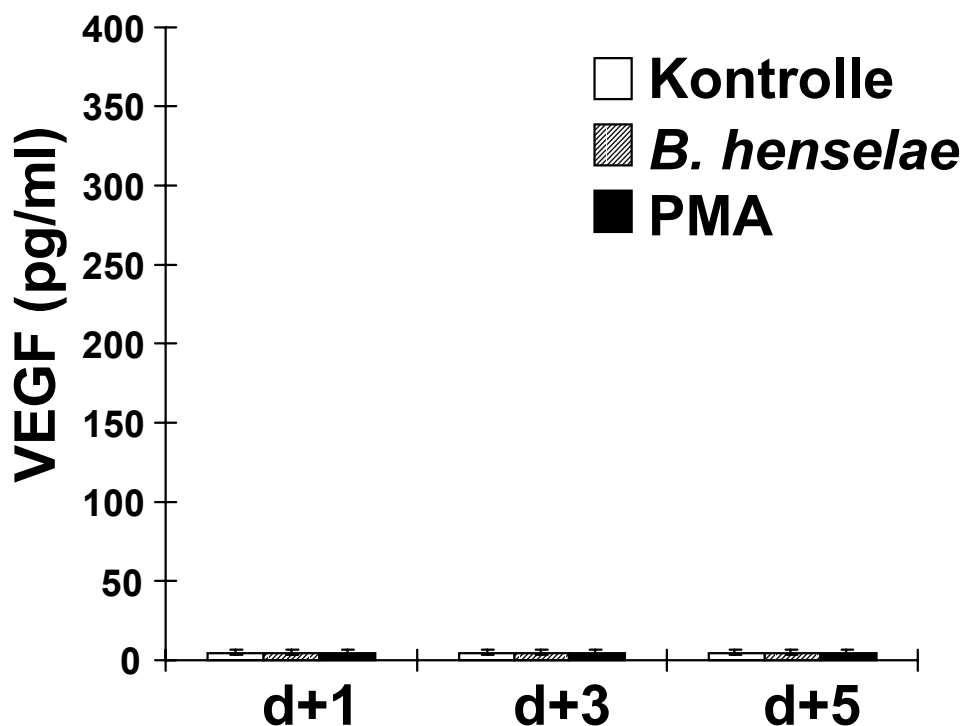


Abb. 4: VEGF-Produktion von HUVEC nach Infektion mit *B. henselae*.

Messung der VEGF-Spiegel im Zellkulturüberstand nach 1, 3 und 5 Tagen mittels ELISA; HUVECs wurden mit *B. henselae* (MOI 285) infiziert; die Kontrollen wurden nicht infiziert oder mit PMA (25 ng/ml) stimuliert.

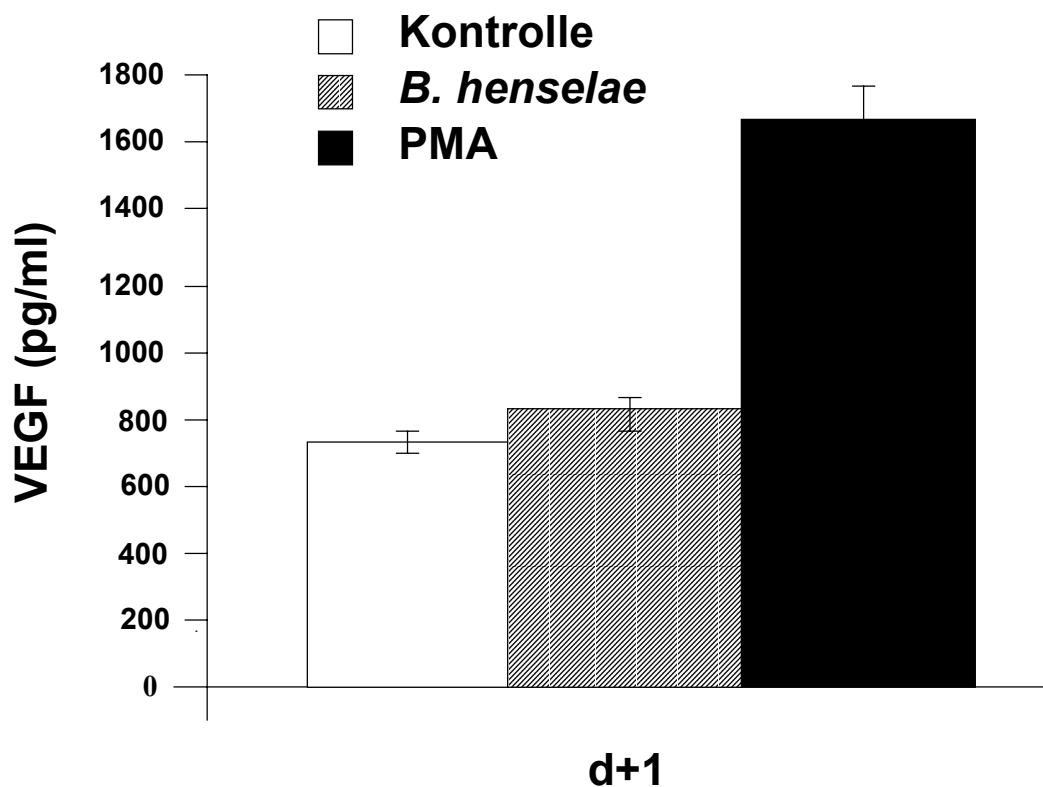


Abb. 5: VEGF-Produktion von CRL-1999 nach Infektion mit *B. henselae*.

Messung der VEGF-Spiegel im Zellkulturüberstand nach 24 Stunden mittels ELISA; CRL-1999 wurden mit *B. henselae* (MOI 285) infiziert; die Kontrollen wurden nicht infiziert oder mit PMA (25 ng/ml) stimuliert.

3.1.2. Nachweis der VEGF Produktion mittels RT-PCR

Um die Induktion von VEGF durch *B. henselae* auch auf messenger-RNA Ebene zu analysieren, wurden Zellen mit *B. henselae* infiziert und nach 1, 2, 3, 6, 18 und 72 Stunden die Gesamt-RNA extrahiert. Nach anschließender reverser Transkription wurde der Anstieg der VEGF-mRNA mittels RT-PCR für VEGF untersucht. Für die RT-PCR wurden zwei verschiedene Primerpaare verwendet (128) (siehe Tab. 5). Bei den Primerpaaren handelt es sich um Splicing-Varianten von VEGF. Das Primerpaar VEGF II lieferte die im folgenden gezeigten deutlicheren Banden.

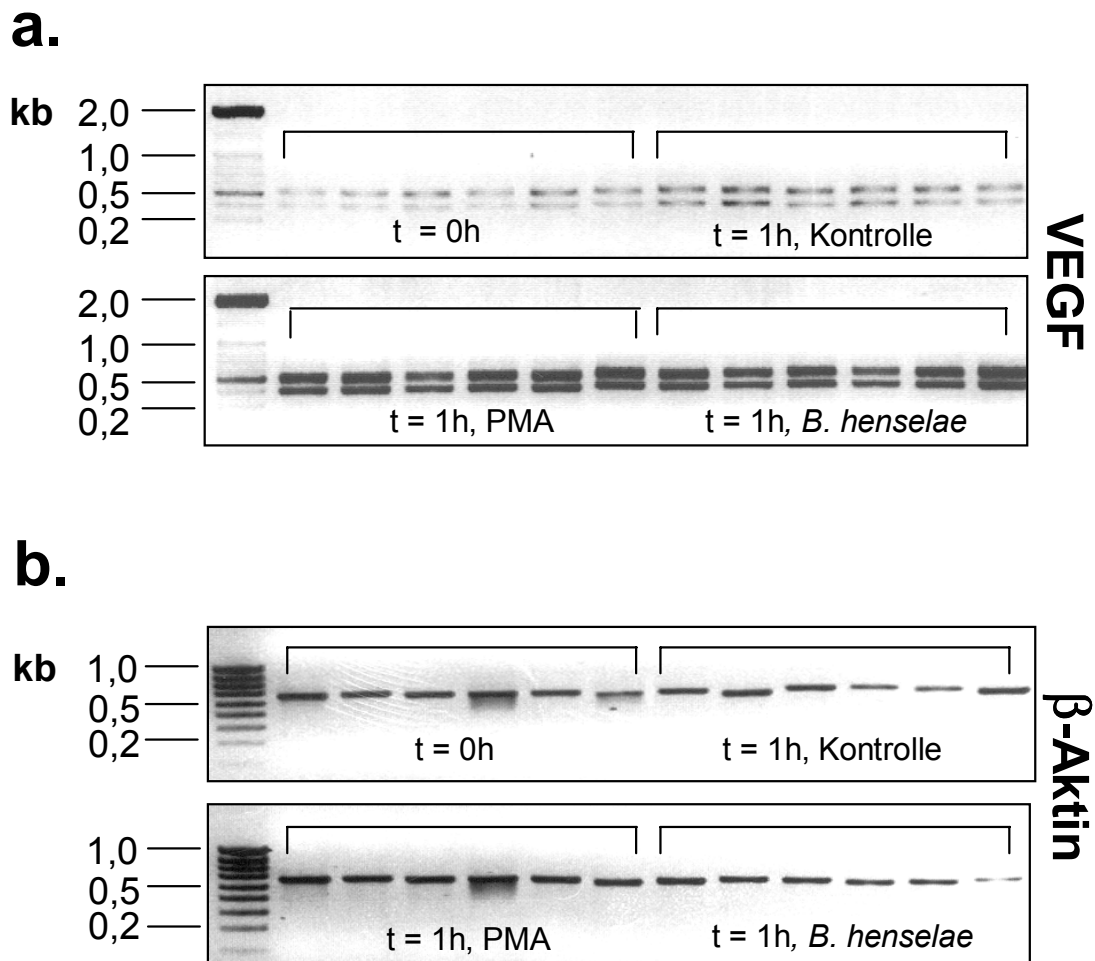


Abb. 6: Induktion der VEGF-mRNA von EA.hy 926 Zellen nach Infektion mit *B. henselae*.

a. Untersuchung des Anstiegs der VEGF-Expression der mRNA mittels RT-PCR; EA.hy 926 Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 285) infiziert und die mRNA zum Zeitpunkt 0 (ohne Infektion oder Stimulation) und nach 1 Stunde isoliert; die Positivkontrollen wurden mit PMA (25 ng/ml) stimuliert, die Negativkontrollen wurden weder infiziert noch stimuliert.

b. interne Kontrolle durch Nachweis der β -Aktin-mRNA. Zeitpunkte t = 0h und t = 1h.

Als interne Kontrollen diente der Nachweis der β -Aktin-mRNA in der Agarosegel-Elektrophorese. Die RNA wurde zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 18 und 72 Stunden nach Infektion isoliert. Die Aktin-PCR lieferte zu allen Zeitpunkten gleichstarke Banden.

Bei der VEGF-PCR waren zum Zeitpunkt 0 h und bei der Negativkontrolle ohne Stimulation keine Banden zu sehen, wogegen nach 1 h die Stärke der Banden nach Infektion mit *B. henselae* der der Positivkontrolle mit PMA entspricht. Das Primerpaar VEGF II lieferte hierbei das deutlichere Ergebnis. (siehe Abb. 6, nur t = 0h und t = 1h gezeigt)

Aus diesen Daten darf geschlossen werden, dass der Anstieg der VEGF-Spiegel nach einer Infektion mit *B. henselae* auf eine Neusynthese der Wirtszellen zurückzuführen ist. Die Experimente zeigten, dass der Anstieg der VEGF-Spiegel in der RT-PCR schon nach der ersten Stunde nach Infektion deutlich sichtbar war, wogegen im VEGF-ELISA die stärksten Anstiege erst nach 72 Stunden zu verzeichnen waren. Somit ist der Anstieg der messengerRNA einer der ersten Schritte auf dem Weg der VEGF-Induktion durch *B. henselae*.

3.2. Infektion von EA.hy 926 und HUVEC mit *Bartonella henselae* und Nachweis der IL-8 Produktion

Ein weiteres Zytokin mit vaskuloproliferativen Fähigkeiten ist Interleukin-8 (196). Zur Untersuchung des Verlaufs der IL-8 Produktion nach einer Infektion mit *B. henselae* wurden EA.hy 926 Zellen und Endothelzellen (HUVEC) infiziert. Als Positivkontrolle diente Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α), das nachweislich zu einer Stimulation der IL-8 Produktion führt.

3.2.1. Nachweis der IL-8 Produktion mittels ELISA

Um einen Anstieg der IL-8 Produktion nachzuweisen, wurde der Zellkulturüberstand der infizierten Zellen nach 72 h abgenommen und die Menge des in den Zellkulturüberstand sekretierten IL-8 mittels ELISA gemessen.

Es zeigte sich, dass es nach einer *B. henselae* - Infektion sowohl in HUVEC, als auch in EA.hy 926 Zellen zu einem Anstieg der IL-8 Produktion kommt. Auffallend hierbei ist, dass die Induktion der IL-8 Synthese im Gegensatz zu anderen bakteriellen Infektionen (z.B. *Y. enterocolitica* WA-C) erst zu relativ späten Zeitpunkten erfolgt. Mit Zunahme der Inkubationszeit kam es bei den Endothelzellen zu einem fast linearen Anstieg der IL-8 Produktion.

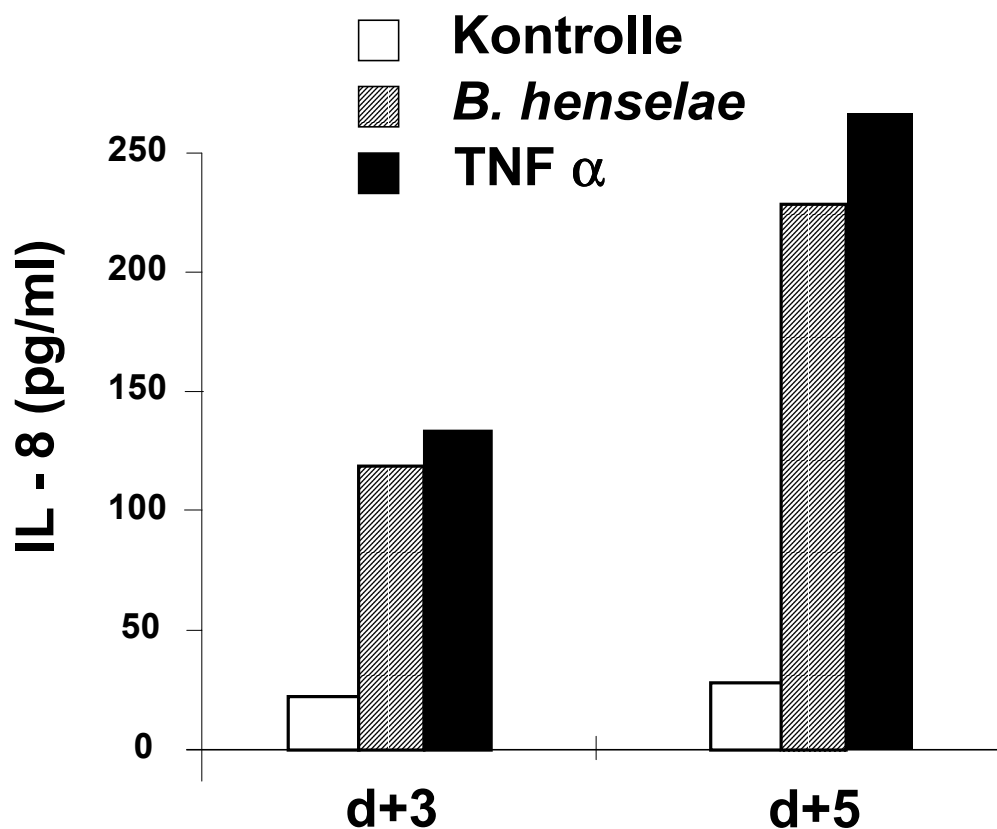


Abb. 7: IL-8-Produktion von Endothelzellen (HUVECs) nach Infektion mit *B. henselae*.

Messung der IL-8-Spiegel im Zellkulturüberstand nach 3 und 5 Tagen mittels ELISA; $1,5 \times 10^6$ HUVECs wurden mit *B. henselae* (MOI 285) infiziert; die Kontrollen wurden nicht infiziert oder mit TNF α (250 ng/ml) stimuliert.

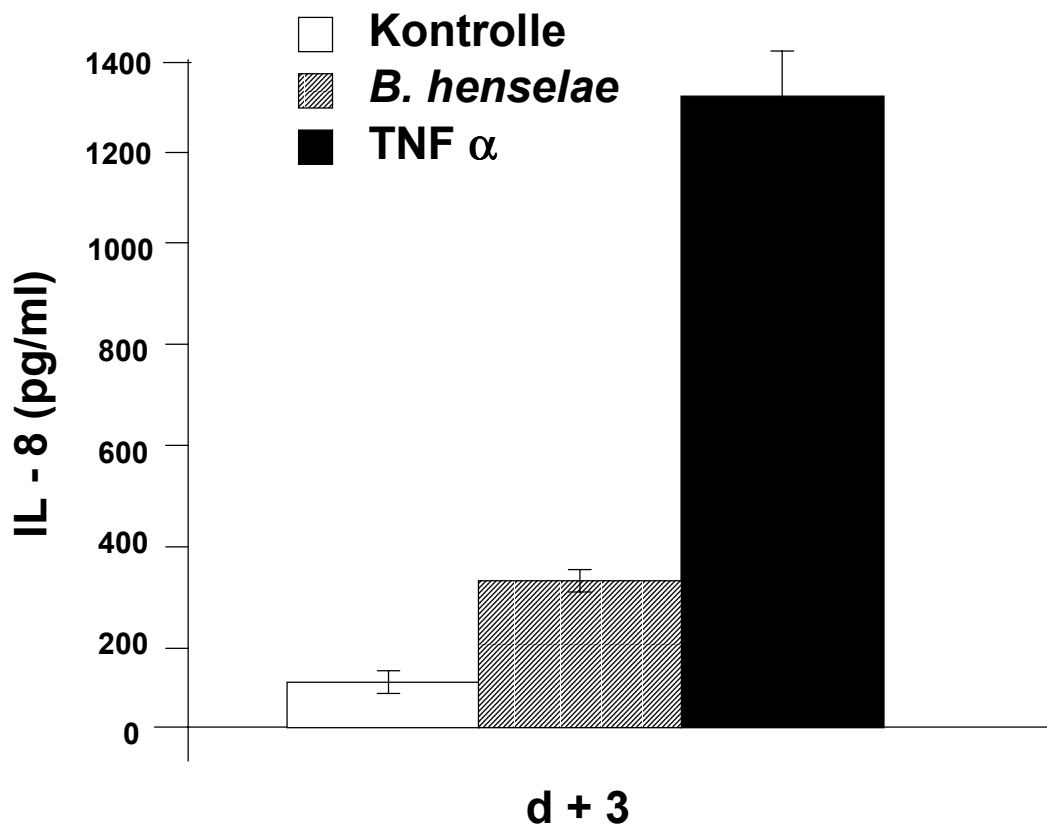


Abb. 8: IL-8-Produktion von EA.hy 926 Zellen nach Infektion mit *B. henselae*.

Messung der IL-8-Spiegel im Zellkulturüberstand mittels ELISA. EA.hy 926 Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 285) infiziert und der Zellkulturüberstand nach 3 Tagen abgenommen; die Kontrollen wurden nicht infiziert oder mit TNF α (250 ng/ml) stimuliert.

3.3. Modulation der VEGF-Synthese

Da bekannt ist, dass *B. henselae* mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert (40), wurde die Produktion des VEGF in Abhängigkeit des Aktin-Zytoskeletts untersucht. Dazu wurden die Zelllinien mit einem Inhibitor der Aktin-Polymerisation (Cytochalasin-D) behandelt. Cytochalasin-D unterdrückt die Polymerisation des Aktinskelettes der Zellen, und damit die Bildung von Invasomen (40), aber nicht die Invasion einzelner *B. henselae*-Bakterien. Weiterhin wurden die Zellen mit einem Wirkstoff inkubiert, der die

Proteinbiosynthese der Wirtszellen blockiert (CHX). Hierdurch sollte untersucht werden, ob es sich bei dem in den Zellkulturüberstand sezernierten VEGF um neu synthetisiertes oder aus Speichern freigesetztes VEGF handelt.

Durch die Zugabe von Cytochalasin-D wurde die VEGF-Produktion nur leicht vermindert, was darauf hindeutet, dass das Aktin-Zytoskelett für den Prozess der VEGF-Synthese nur eine untergeordnete Rolle spielt, obwohl es entscheidend für die Invasombildung ist. Die Inkubation der Zellen mit Cycloheximid supprimierte die VEGF-Produktion jedoch vollständig (siehe Abb. 9).

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass (I) das Aktin-Zytoskelett bei der Induktion der VEGF-Produktion zweitrangig ist und es sich (II) um eine *de novo*-Proteinsynthese des Zytokins VEGF handelt, die durch den entsprechenden Inhibitor unterdrückt werden kann .

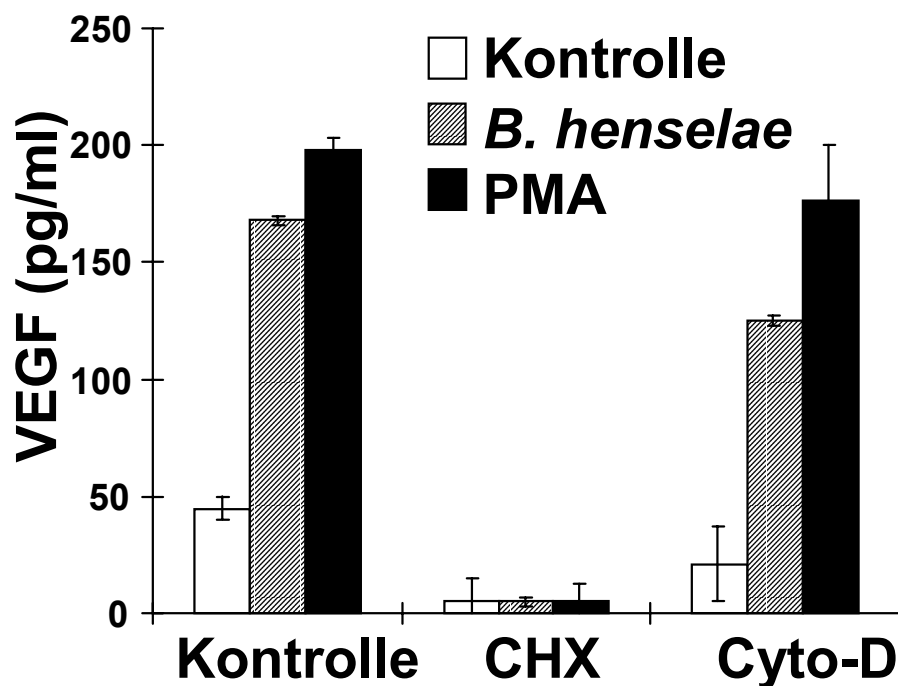


Abb. 9: VEGF-Produktion durch EA.hy 926 Zellen nach Infektion mit *B. henselae* und Modulation der VEGF-Produktion durch Cycloheximid (CHX) und Cytochalasin-D (Cyto-D).

Messung der Zytokin-Spiegel aus dem Zellkulturüberstand nach 3 Tagen mittels VEGF-ELISA; die Kontrollen wurden nicht infiziert oder mit PMA (25 ng/ml) stimuliert.

3.4. Untersuchungen zur Natur des VEGF-induzierenden Faktors von *B. henselae*

3.4.1. Induktion von VEGF durch *Bartonella henselae*: Dosis-Wirkungs-Kurve

Um die Infektionsdosis zu ermitteln, mit der die höchsten VEGF-Spiegel erreicht werden können, wurden EA.hy 926 Zellen mit verschiedenen Infektionsdosen (MOI 3, 30, 300, 600, 900) infiziert. Der Zellkulturüberstand wurde nach 72 Stunden abgenommen und mittels ELISA vermessen. Die höchsten Anstiege der VEGF-Produktion wurden mit einer Infektionsdosis von 300 bis 900 *B. henselae* pro Zelle erzielt (siehe Abb.10).

Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei der Induktion der VEGF-Synthese nicht um einen „Alles - oder - Nichts“ – Effekt handelt, sondern dass ein Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung besteht.

3.4.2. Kokultur von EA.hy 926 Zellen mit hitzegetöteten *Bartonella henselae*: Dosis-Wirkungs-Kurve

Zur Überprüfung, ob präformierte bakterielle Strukturen (z. B. Proteine) die VEGF-Induktion bedingen, wurden EA.hy 926 Zellen mit viablen und mit hitzegetöteten *B. henselae* (1h bei 60°C) infiziert. Hierbei wurden verschiedene Infektionsdosen (MOI 3, 30, 300, 600, 900) verwendet.

Es zeigte sich, dass eine Inkubation der Zellen mit hitzegetöteten *B. henselae* die VEGF-Produktion auch ansteigen ließ, allerdings nur um etwa 30% - 50 % des Wertes, der durch eine Infektion mit lebenden *B. henselae* erreicht wurde (siehe Abb. 10).

Da auch hitzegetötete Bakterien zu einer - wenngleich geringeren - VEGF-Produktion führen, kann vermutet werden, dass z. B. ein bakterielles Oberflächenprotein eine entscheidende Rolle spielen könnte, weitere Faktoren oder Mechanismen, die nur in der Interaktion der Wirtszellen mit lebenden *B. henselae* stattfinden, jedoch ebenfalls von Bedeutung sind.

3.4.3. Kokultur von EA.hy 926 Zellen mit *Bartonella henselae* - Sonifikaten

Inwieweit intakte Bakterien oder Bestandteile von Bakterien nötig sind, um einen Anstieg der VEGF-Spiegel zu bewirken, sollte durch Kokultur von EA.hy 926 Zellen mit *B. henselae* - Sonifikaten untersucht werden. Nach Kokultur mit Erreger-Sonifikaten ergab sich nur eine geringere Steigerung der VEGF-Produktion,

vergleichbar mit der durch hitzegetötete *B. henselae* induzierten Steigerung. Wie durch anschließende Sterilkontrollen gezeigt wurde, konnten *B. henselae* allerdings auch durch mehrmaliges langes Sonifizieren nicht vollständig abgetötet werden (< 1 % Restviabilität). (Daten nicht gezeigt)

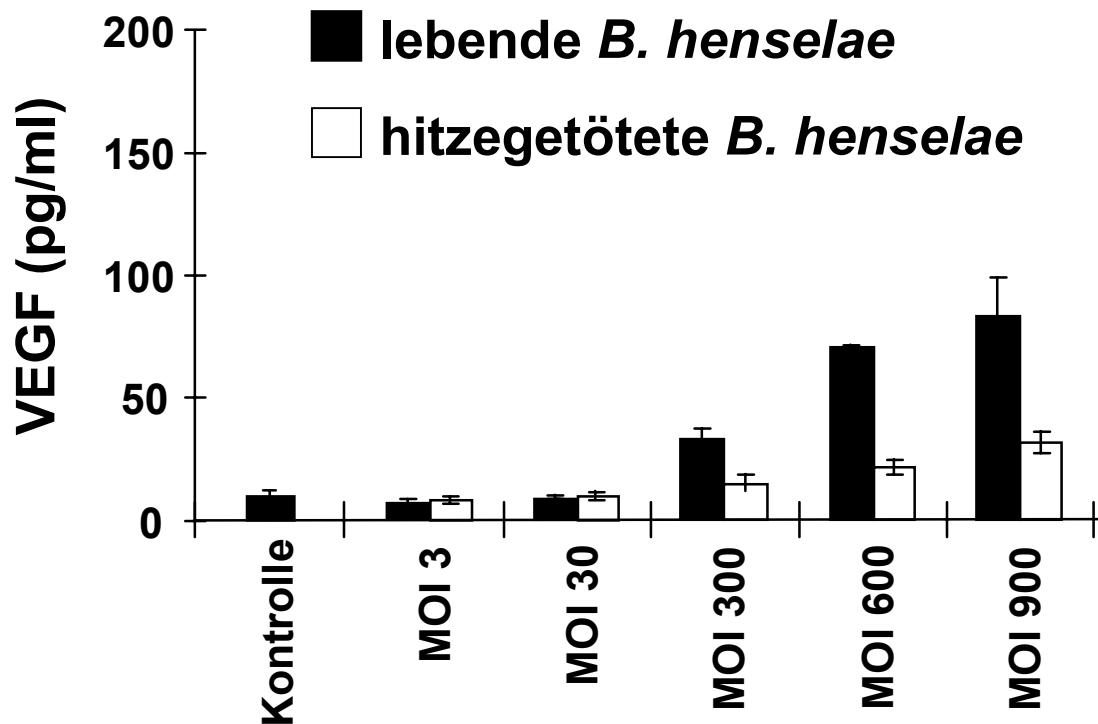


Abb. 10: VEGF-Produktion von EA.hy 926 Zellen nach Kokultur mit *B. henselae* in verschiedenen mittleren Infektionsdosen mit viablen und hitzegetöteten *B. henselae*.

Messung der VEGF-Spiegel im Zellkulturüberstand mittels ELISA. EA.hy 926 Zellen wurden zum Vergleich mit viablen und hitzegetöteten *B. henselae* (MOI 3, 30, 300, 600 und 900) infiziert und der Zellkulturüberstand nach 3 Tagen abgenommen; die Kontrollen wurden nicht infiziert oder mit PMA (25 ng/ml) stimuliert.

3.5. Spezifitätskontrolle der VEGF-Induktion

Um festzustellen, ob es sich bei der Induktion der VEGF-Produktion um einen für *B. henselae* spezifischen Prozess handelt, wurden verschiedene Bakterien auf ihre Fähigkeit untersucht, die VEGF-Produktion zu induzieren. Weder *Listeria*

monocytogenes EGD serotyp 1/2a (5), noch eine Infektion mit nicht-invasiven *E. coli* (HB101) (162), noch die Kokultivierung mit *Yersinia enterocolitica*-Invasin-exprimierenden *E. coli* pInv1914 oder mit Lipopolysacchariden (LPS) von *E. coli* konnte die Menge an produziertem und in den Zellkulturüberstand sezernierten VEGF signifikant steigern (siehe Abb. 11), was vermuten lässt, dass die durch *B. henselae* induzierte VEGF-Produktion auf einem für den Erreger *B. henselae* spezifischen Faktor beruht.

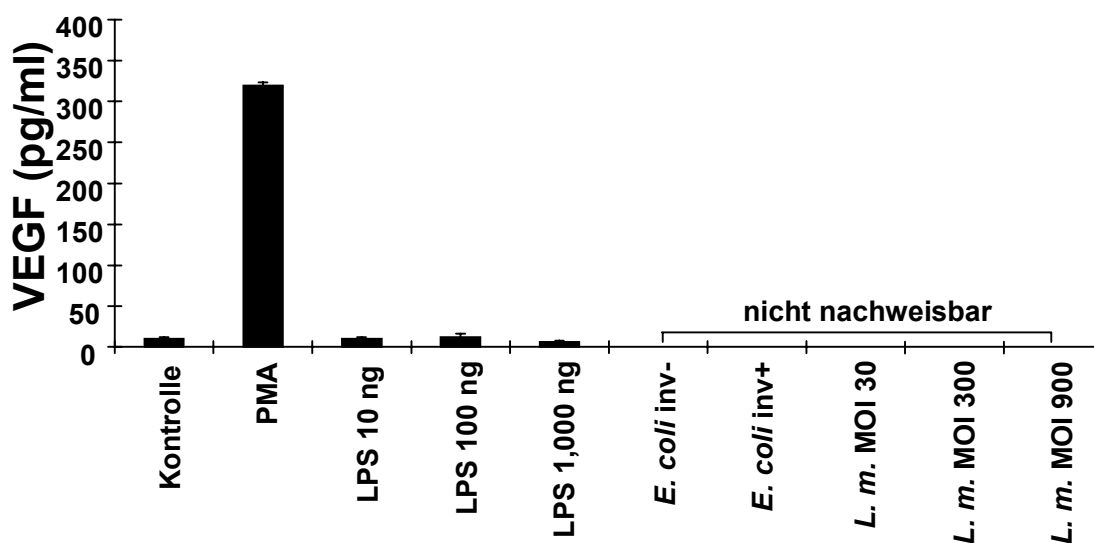


Abb. 11: VEGF-Produktion von EA.hy 926 Zellen nach Kokultur mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS), nach Infektion mit *E. coli* HB101 (inv-), *E. coli* pInv 1914 (inv+) und *Listeria monocytogenes* (in verschiedenen MOI).

Messung der VEGF-Spiegel im Zellkulturüberstand nach 3 Tagen mittels ELISA; die Kontrollen wurden nicht infiziert oder mit PMA (25 ng/ml) stimuliert.

3.6. Untersuchungen zum Einfluß der Pilusexpression auf die VEGF-Produktion in EA.hy 926 Zellen

Adhärenz an und Invasion in Wirtszellen hängt von der Fähigkeit von *B. henselae* ab, Typ-4 - ähnliche Pili zu exprimieren (10). Nach langen Passagezeiten verliert der Erreger jedoch diese Fähigkeit (4, 10).

Um zu untersuchen, inwieweit dieser einzige bislang beschriebene mögliche Pathogenitätsfaktor bei dem Prozess der VEGF-Induktion in den Wirtszellen eine Rolle spielt, wurden Zellen sowohl mit dem Pilus-exprimierenden Wildtyp (Pil^+), als auch mit der Pilus-negativen Variante (Pil^-) von *B. henselae* infiziert. Zu diesem Zweck wurden Pilus-negative Spontanvarianten durch lange Passagezeiten (50 Subkultivierungen über 10 Monate) auf Columbia-Agar hergestellt, bis die Kolonie-Morphologie vom rauen zum glatten Phänotyp überging und damit das Fehlen der Pili anzeigte. Mittels elektronenmikroskopischer Bilder wurde die fehlende Pilus-Expression nachgewiesen (siehe Abb.12).

3.6.1. Induktion der VEGF-Produktion durch *B. henselae* Pil^+ und *B. henselae* Pil^-

B. henselae Pil^+ induzieren eine signifikante VEGF-Produktion in EA.hy 926 Zellen. Im Folgenden wurde deshalb diese Zelllinie zum Vergleich mit jeweils verschiedenen mittleren Infektionsdosen (MOI 30, 300, 900, 1200) von *B. henselae* Pil^+ und *B. henselae* Pil^- infiziert, der Zellkulturüberstand nach 3 Tagen abgenommen und die Menge des in den Zellkulturüberstand sezernierten VEGF bestimmt.

Im Vergleich zu den Pil^+ Stämmen führte die Infektion mit Pil^- Varianten zu einer deutlich geringeren VEGF-Produktion, deren Wert nur knapp über dem der Negativkontrolle lag.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Expression der Pili von entscheidender Bedeutung bei der Induktion der VEGF-Produktion ist, und als Schlüsselmechanismus verstanden werden kann.

3.6.2. Untersuchungen zur Rolle der Pili von *B. henselae* bei Adhäsion an und Invasion in EA.hy 926 Zellen

Da die Adhärenz an und die Invasion des Erregers in die Wirtszellen eine wichtige Voraussetzung für die Induktion der VEGF-Expression in Wirtszellen ist, wurden diese beiden Parameter für *B. henselae* Pil^+ und *B. henselae* Pil^- in einem „Gentamycin-protection-assay“ gemessen.

B. henselae Pil^- Spontanvarianten zeigten eine um 90% geringere Adhärenz an und Invasion in die Wirtszellen (Abb 12). Daher lässt sich vermuten, dass die durch die Pilus-Expression vermittelte Adhäsion an und Invasion in die Wirtszellen eine wichtige Voraussetzung für die Induktion der VEGF-Produktion ist.

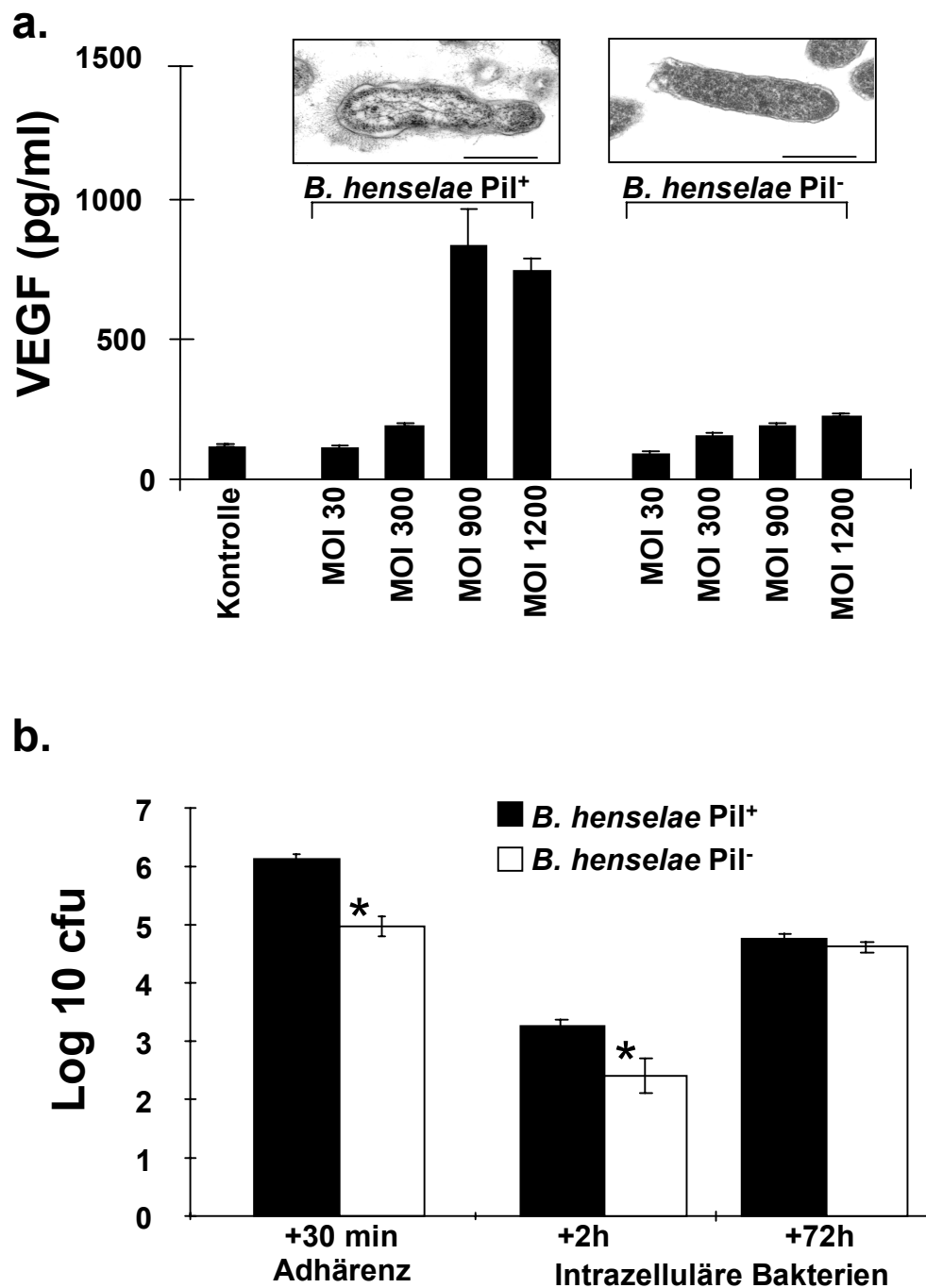


Abb. 12: VEGF-Produktion von EA.hy 926 Zellen nach Infektion mit *B. henselae* Pil⁺ und Pil⁻ und Untersuchungen zu Adhärenz an und Invasion in Wirtszellen;

a. Messung der VEGF-Spiegel im Zellkulturüberstand mittels ELISA. EA.hy 926 Zellen wurden mit *B. henselae* Pil⁺ und Pil⁻ (MOI 30, 300, 900, 1200) infiziert und der Zellkulturüberstand nach 3 Tagen vermessen. Nachweis der Pili-Expression mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Maßeinheit = 0,5 μ m.

b. Adhärenz (30 min) von *B. henselae* Pil⁺ und *B. henselae* Pil⁻ Varianten an EA.hy 926 Zellen, Invasion (2 h) und intrazelluläres Wachstum (72 h) der Bakterien in den Wirtszellen.

3.7. Vaskuloproliferativer Effekt der konditionierten Medien

Eine Infektion mit *B. henselae* kann zu Vaskuloproliferationen der Haut (BA) oder anderer Organe (BP) führen (110, 111). Wie in den vorher beschriebenen Experimenten bereits gezeigt werden konnte (siehe 3.1.1, Abb. 4), können die Endothelzellen selbst jedoch nach Infektion mit *B. henselae* kein VEGF produzieren. Man könnte annehmen, dass eine parakrine VEGF-Produktion einen stimulierenden Einfluss auf die Endothelzellen ausübt und dadurch zur Endothelzellproliferation und damit zur Neoangiogenese führt.

3.7.1. Nachweis eines vaskuloproliferativen Effektes von konditionierten Medien mittels ³H-Thymidin Proliferationsassay

Um nachzuweisen, dass die Infektion von EA.hy 926 Zellen durch *B. henselae* zur Produktion von biologisch aktivem VEGF führt, wurden HUVECs mit dem Zellkulturüberstand aus den Infektionsexperimenten stimuliert, mit ³H-Thymidin inkubiert und die Proliferation durch die ³H-Thymidin Aufnahme in die DNA der Zellen quantifiziert. Als Vergleichsgruppen wurde humanes rekombinantes VEGF in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben (0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml, 10 ng/ml). Aus dem Verhältnis der Proliferationsrate der stimulierten Zellen zur Proliferationsrate der unstimulierten Zellen wurde der Stimulationsindex (SI) berechnet. Bei 10 ng/ml rhVEGF lag der SI zwischen 8 und 10, bei Kokultivierung mit 1:10 verdünntem konditioniertem Medium der mit *B. henselae* infizierten EA.hy 926 Zellen lag der SI bei Werten zwischen 25 und 70. Durch Zusatz von 10 µg/ml Anti-VEGF-Antikörper konnte der SI um bis zu 50 % reduziert werden (siehe Abb. 13).

Daraus kann geschlossen werden, dass (I) durch *B. henselae* induziertes VEGF biologisch aktiv ist und (II) außerdem VEGF selbst zu überwiegendem Anteil die Stimulation der HUVEC-Proliferation bedingt. Wahrscheinlich tragen noch eine Vielzahl anderer im Zellkulturüberstand enthaltener Wachstumsfaktoren (wie z. B. IL-8) zur Endothelzellstimulation bei („Cocktail-Hypothese“).

3.7.2. Nachweis eines vaskuloproliferativen Effektes von konditionierten Medien mittels Phasenkontrastmikroskopie

Parallel zum Proliferationsassay wurden HUVECs ausgesät und auf die gleiche Weise mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem humanem VEGF und

konditioniertem Zellkulturüberstand aus Infektionsexperimenten stimuliert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit PFA fixiert und gewaschen und anschließend mit einem Plattenmikroskop untersucht und fotografiert. Auf den Bildern konnte man - korrelierend zu den Daten aus den ^3H -Thymidin Proliferationsassays - ebenfalls eine Zunahme der Proliferation der Zellen unter dem Einfluß der konditionierten Medien nachweisen (siehe Abb. 13).

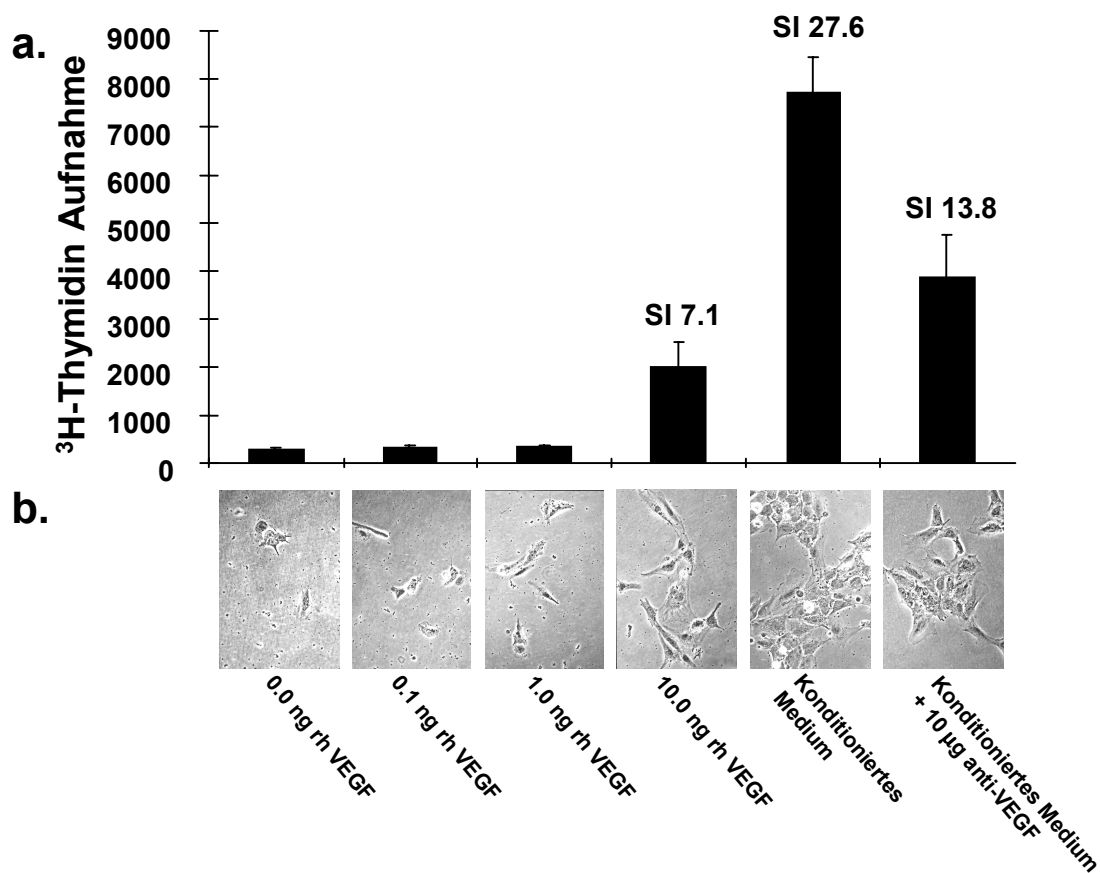


Abb. 13: Proliferation von nicht-infizierten Endothelzellen (HUVECs) nach Kultivierung mit konditioniertem Medium aus *B. henselae*-infizierten Zellkulturen.

a. ^3H -Thymidin-Aufnahme von HUVECs, nach Behandlung mit sterilfiltriertem und 1:10 verdünntem konditioniertem Medium aus *B. henselae*-infizierten EA.hy 926-Zellkulturen. (Kontrollen: 0,0; 0,1; 1,0; und 10,0 ng/ml rekombinantes humanes VEGF; VEGF-neutralisierender Antikörper: 10,0 µg/ml). SI: Stimulationsindex.

b. Morphologie der HUVECs in der Phasenkontrastmikroskopie nach Behandlung mit rekombinantem humanem VEGF und filtriertem konditioniertem Medium aus *B. h.*-infizierten EA.hy 926 Zellkulturen.

3.8. Replikation von *Bartonella henselae* in proliferierenden Endothelzellen

Wie bereits früher gezeigt, replizieren *B. henselae* in Endothelzellen (98). Deswegen könnte die oben beschriebene Bakterien-induzierte Proliferation der Endothelzellen wiederum zu einer Anregung des Wachstums von *B. henselae* und zu einer Verbesserung der Überlebensbedingungen des Erregers führen.

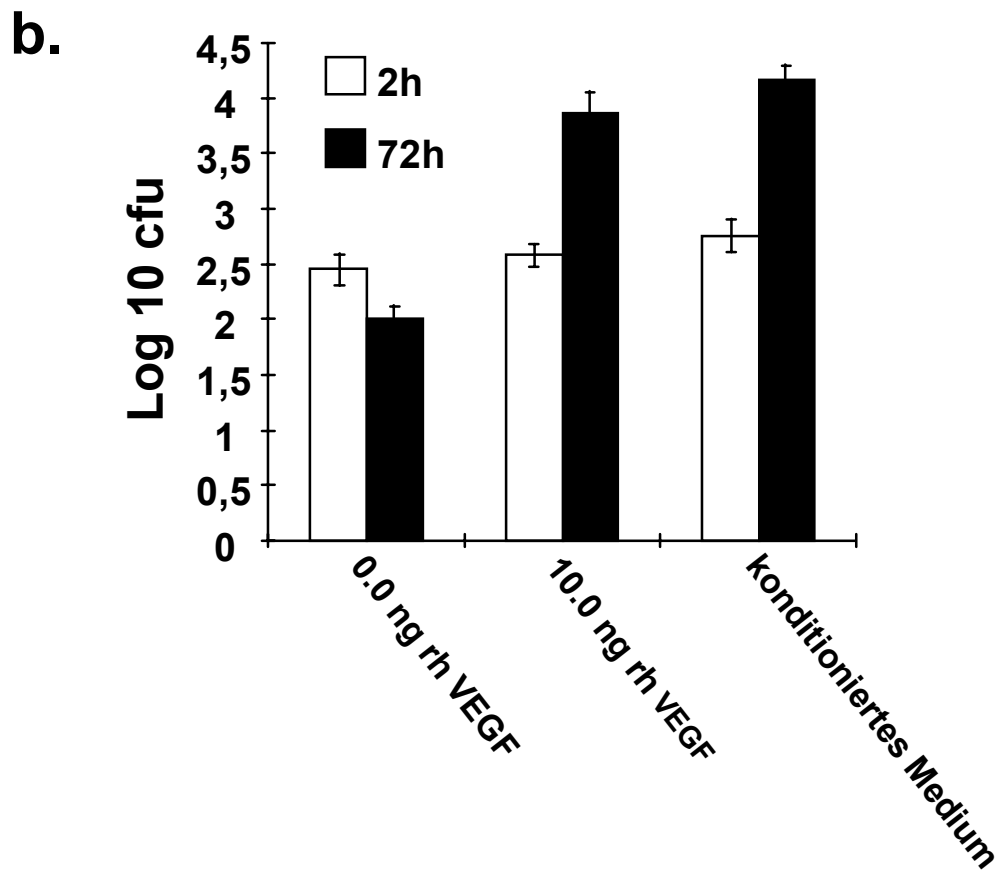
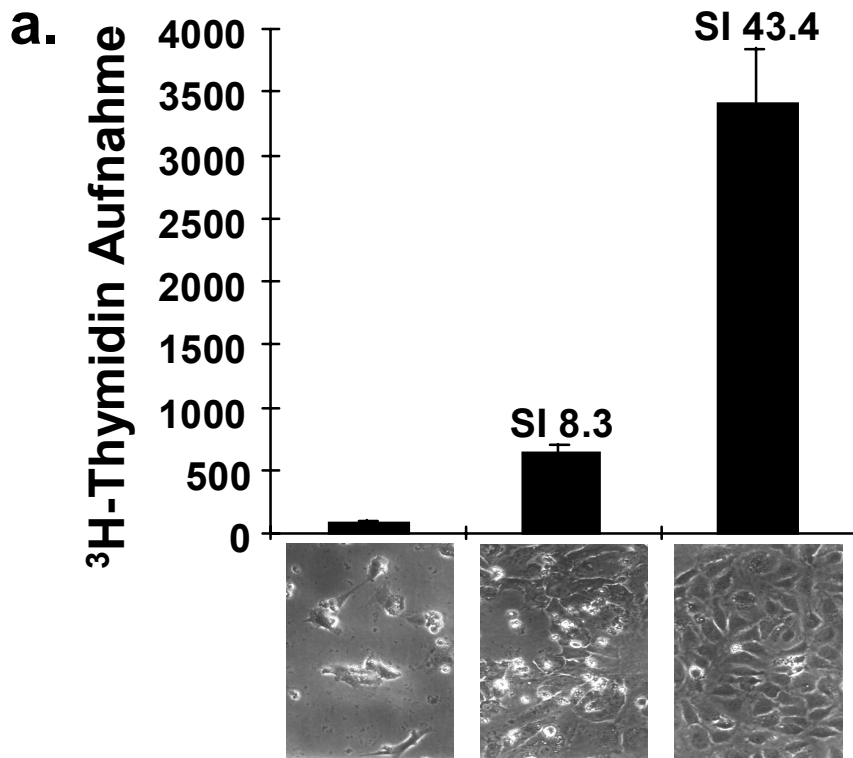
Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden *B. henselae* mit ruhenden sowie mit proliferierenden Endothelzellen (HUVECs) kokultiviert und die Menge der intrazellulären Erreger nach 72 h mittels „Gentamycin-protection-assay“ bestimmt. In diesen Experimenten konnten stark erhöhte Wachstumsraten bei *B. henselae* beobachtet werden, die mit proliferierenden HUVECs (10ng/ml rhVEGF oder konditioniertes Medium) kokultiviert wurden. Der Stimulationsindex der HUVECs nach Inkubation mit 10,0 pg/ml VEGF betrug 8,3 und hatte eine etwa 75-fach erhöhte Wachstumsrate zur Folge. Der Stimulationsindex nach Inkubation mit konditioniertem Medium belief sich auf 43,4, was einer ca. 150-fach erhöhten Wachstumsrate entspricht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proliferation von Endothelzellen die Wachstumsbedingungen für *B. henselae* verbessern. Basierend auf diesen Beobachtungen, kann man vermuten, dass die vaskuloproliferativen Erkrankungen Bazilläre Angiomatose (BA) und Bazilläre Peliose (BP) dem Erreger dazu dienen, sich seine eigenen Lebensbedingungen zu optimieren und sich sein eigenes Habitat zu schaffen.

Abb. 14 (siehe nächste Seite): Anzahl intrazellulärer *B. henselae* in proliferierenden Endothelzellen (HUVECs) nach Stimulation mit VEGF oder konditioniertem Medium aus infiziertem Zellkulturüberstand.

a. ³H-Thymidin-Aufnahme und Morphologie (Phasenkontrastmikroskopie) von HUVECs nach Behandlung mit sterilfiltriertem und 1:10 verdünntem konditioniertem Medium von *B. henselae* – infizierten EA.hy 926 Zellkulturen (Kontrollen: 0, 10,0 ng/ml rekombinantes humanes VEGF). SI: Stimulationsindex.

b. Anzahl der intrazellulären *B. henselae* (+2 h, +72 h) in HUVECs, bestimmt mittels „Gentamycin-protection-assay“.



4. Diskussion

Die Fähigkeit Endothelzell-Proliferationen zu induzieren, ist eine gemeinsame Eigenschaft von *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* und *Bartonella bacilliformis* (4, 69). Dieses angiogenetische Potential ist von besonderem Interesse, wenn es darum geht, bakteriell induzierte Tumorbildung zu verstehen. Das Wachstum solider Tumoren hängt von der Ausbildung eines feinen Netzwerkes von Blutgefäßen ab und beruht auf einem ausgewogenen Gleichgewicht positiver und negativer Regulatoren der Angiogenese. Ohne die Versorgung durch neue Blutgefäße könnten Tumoren nicht über eine kritische Größe wachsen oder in andere Organe metastasieren. Durch die Untersuchung der Tumorinduktion durch Bakterien könnten neue Einblicke in pathologische Angiogenese und Tumorwachstum erzielt werden.

4.1. Induktion von Vaskuloproliferationen durch *Bartonella henselae*: die Rolle von VEGF

Bartonella henselae wurde als Krankheitserreger der bazillären Angiomatose, bazillären Peliosis hepatis, Katzenkratzkrankheit, Bakteriämie und Endokarditis identifiziert (4, 46). Durch histologische Untersuchungen an Patientenbiopsaten konnte gezeigt werden, dass BA in engem Zusammenhang mit der Proliferation von Endothelzellen steht (127, 158). Dieser angiogenetische Prozeß wird von *Bartonella spp.* verursacht, da es nach einer bakteriellen Eradikationsbehandlung mittels intrazellulären Antibiotika, wie Clarithromycin oder Doxycyclin zu einer kompletten Rückbildung der Angiomatose kommt (187). Zudem konnten in den Patientenbiopsaten die Bakterien selbst auch subendothelial nachgewiesen werden.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des wichtigsten angiogenetischen Faktors, des Zytokins VEGF, bei der Entstehung von *B. henselae*-induzierten Gefäßproliferationen (BA, BP) (4) in einem *in-vitro* Modell zu untersuchen. VEGF spielt eine fundamentale Rolle in der pathologischen Neoangiogenese (193), die z.B. bei Wundheilung, Retinopathie, Ischämien und vor allem bei Tumoren (58) auftritt, und ist ein hochspezifischer proliferativer Faktor für Endothelzellen (112). Bei der Pathogenese des ebenfalls bei Immunsupprimierten vorkommenden vaskuloproliferativen Krankheitsbildes „Kaposi-Sarkom“, das durch das humane Herpesvirus 8 (HHV-8) verursacht wird, wurde eine entscheidende Rolle für VEGF

bereits nachgewiesen (121). Dabei sind ebenfalls die im Kaposi-Sarkom liegenden Endothelzellen der Hauptort für die Replikation des HHV-8 (134).

Bis heute wurden jedoch nur wenige widersprüchliche Daten veröffentlicht, die Bezug auf die Pathogenese der durch *B. henselae* verursachten angiogenetischen Erkrankungen nehmen: Es wurde angenommen, dass eine direkte Interaktion von *B. henselae* mit den Endothelzellen zu einem Anstieg der Endothelzellproliferation führt (37, 133). Des Weiteren wurde vorgeschlagen, dass der für die Proliferation verantwortliche Faktor ein Membranprotein von *Bartonella henselae* ist (37). Von Maeno et al. (116) wurde dagegen ein löslicher Faktor postuliert, der von *B. henselae* selbst sezerniert wird. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der Zellkulturüberstand menschlicher monozytärer Zellen, die mit *B. henselae* infiziert wurden zu einer Neovaskularisierung in einem Modell mit Hühnerembryo-Allantoismembranen führt (67). Dies deutete schon zu diesem Zeitpunkt darauf hin, dass durch Wirtszellen sezernierte vaskuloproliferative Faktoren eine Rolle bei der Entstehung der bazillären Angiomatose oder Peliose spielen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach einer Infektion epithelialer Wirtszellen mit dem Erreger *B. henselae* zur Induktion einer VEGF-Produktion und zur Sekretion dieses VEGF in den Zellkulturüberstand kommt, in dem es mittels ELISA nachweisbar ist.

4.2. Abhängigkeit der *B. henselae*-induzierten VEGF-Produktion vom Zelltyp

Die Induktion der VEGF-Produktion nach *B. henselae*-Infektion ist abhängig vom Typ der Wirtszellen. Erst kürzlich wurde nachgewiesen, dass eine Infektion von Endothelzellen mit *Bartonella bacilliformis* zu einem Anstieg der Spiegel der VEGF-mRNA führt (185). Im Rahmen dieser Arbeit kam es jedoch zu keinem Anstieg der VEGF-Spiegel im Zellkulturüberstand von Endothelzellen, die mit *B. henselae* infiziert wurden.

Obwohl die meisten Zellarten VEGF produzieren, transkribierten Endothelzellen im Gegensatz zu den anderen Zellen das VEGF-Gen nur in sehr geringem Maße (7, 49). Diese Tatsache könnte erklären warum HUVECs, anders als EA.hy 926 und Hela 229 Zellen nicht mit einem Anstieg der VEGF-Produktion auf eine Kokultivierung mit *Bartonella henselae* reagieren.

Ebenso kam es nach Infektion von glatten Muskelzellen zu keinem Anstieg der VEGF-Produktion. Bei den in dieser Arbeit verwendeten EA.hy 926 Zellen, die durch eine Fusion der Lungenkarzinomzelllinie A549 mit Endothelzellen entstanden ist, war dagegen ein deutlicher Anstieg vaskuloproliferativer Zytokine zu verzeichnen (siehe Tab. 9).

4.3. Bakterien-induzierte Vaskuloproliferationen und deren Entstehungsmechanismus: spezifisch für *Bartonella henselae*?

Die Induktion inflammatorischer Zytokine, die vaskuloproliferative Effekte teilen (z.B. IL-8) wurde auch für andere bakterielle Infektionen gezeigt, wie z. B. für *Yersinia enterocolitica* (161), für *Helicobacter pylori* (192) und für *Shigella flexneri* (136). Es konnte auch gezeigt werden, dass *Pneumokokken* eine VEGF-Sekretion bei *in vitro* stimulierten neutrophilen Granulozyten hervorrufen, was als Mediator für die gesteigerte Gefäßpermeabilität bei Meningitis wirken könnte (183). Eine *Mycobacterium tuberculosis* – Infektion führt ebenfalls zu einer Induktion von VEGF in Phagozyten (138) und auch bei Patienten mit spontaner bakterieller Peritonitis konnten erhöhte VEGF-Spiegel in Makrophagen nachgewiesen werden (27).

Im Gegensatz zu *B. henselae* induzieren alle diese Erreger jedoch keine vaskuloproliferativen Erkrankungen. Der Grund warum *Bartonella spp.* eine einzigartige Rolle bei der Induktion von Endothelzellproliferationen spielt, bleibt weiterhin unklar. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Produktion von VEGF ein *Bartonella*-spezifischer Prozess ist, der durch intrazelluläre Bakterien verursacht wird, die die Funktion der Wirtszellen nur minimal beeinflussen und nicht zum Zelltod führen, wogegen andere Bakterien, wie z.B. *Pneumokokken* Gewebeschäden und Apoptose hervorrufen (201).

Die in dieser Arbeit verwendeten bakteriellen Kontrollen *E. coli* HB 101, *E. coli* pINV1914 (*Y. enterocolitica*-Invasin exprimierend), *Listeria monocytogenes* EGD serotype 1/2 a und LPS von *E. coli* wurden gewählt, da von ihnen bekannt ist, dass sie viele verschiedene Zytokine induzieren. Lipopolysaccharide gramnegativer Erreger, spielen beispielsweise eine wichtige Rolle bei septischen Krankheitsbildern, wo sie zur Induktion einer Vielzahl von Mediatoren und Zytokinen führen (72). All diese Kontrollen waren im Gegensatz zu *B. henselae* jedoch nicht in der Lage, nachweisbare Mengen an VEGF zu induzieren (siehe Abb.11). Daraus läßt sich schließen, dass im

Rahmen einer Kokultivierung von Wirtszellen mit Bakterien oder bakteriellen Bestandteilen die Induktion einer VEGF-Produktion in Wirtszellen kein verbreitetes Phänomen ist. Wahrscheinlich kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um einen für *B. henselae* spezifischen Prozess handelt, da verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre Erreger untersucht wurden. Andererseits ist es möglich, dass gerade die hier verwendeten bakteriellen Kontrollen zu keiner VEGF-Induktion führen, jedoch andere z. B. obligat intrazelluläre Bakterien (z. B. Chlamydien) diese Fähigkeit besitzen. Um den Mechanismus der *B. henselae*-induzierten vaskuloproliferativen Erkrankungen vollends zu verstehen, müssen z. B. mit intrazellulären Erregern weitere Experimente durchgeführt werden.

4.4. Mechanismen der Bakterien-Wirt-Interaktion

4.4.1. Einfluss der Pili auf die VEGF-Induktion

Die Adhärenz von *B. henselae* an epitheliale und endotheliale Zellen, und die Invasion des Erregers in diese Wirtszellen wurde bereits mehrfach nachgewiesen (10, 40, 98).

Der Invasion von *B. henselae* in die Epithelzellen geht die Adhäsion an die Zellen voraus, die vermutlich durch die Expression von Typ-4 Pili vermittelt wird (10). Es ließ sich nachweisen, dass Pil⁻ *B. henselae* Varianten eine um 90 % geringere Adhäsion an und Invasion in Wirtszellen zeigten als der Pil⁺ Wildtyp. Dies ist von besonderer Bedeutung für die Induktion der VEGF-Produktion durch *B. henselae*. Nach dem Verlust dieser Typ-4 Pili (elektronenmikroskopisch erkennbar) vermindert sich gleichzeitig die Fähigkeit der Bakterien an ihre Wirtszellen zu adhären. Die Stimulation der VEGF-Produktion der Wirtszellen durch die Bakterien nimmt ab und damit lassen sich signifikant verringerte VEGF-Spiegel im ELISA messen. Daraus lässt sich schließen, dass der anfängliche Bakterien-Wirtszellkontakt, der durch die Pili vermittelt wird, für den Prozeß der VEGF-Induktion ausschlaggebend ist.

Drei Tage nach Infektion erreichten Pil⁻ *B. henselae* ähnliche intrazelluläre Mengen, und induzierten trotzdem nur eine sehr geringe VEGF-Produktion. Diese Daten liegen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, dass bei manchen Pflanzen Adhäsion bzw. Invasion von Bakterien die Produktion von Zytokinen in den Wirtszellen oder eine Pflanzenzellproliferation induzieren (93, 123). Derartige Beobachtungen weisen auf eine herausragende Rolle bakterieller Oberflächenmoleküle (OMPs) hin. Dabei konnte

durch das 43 kD OMP von *B. henselae*, das an intakte Endothelzellen zu binden scheint, bislang allerdings keine Induktion von VEGF nachgewiesen werden.

Ein hoher Anstieg der VEGF-Spiegel konnte nur nach einer Infektion mit lebenden Pili-tragenden *B. henselae* erzielt werden. Bei hitzegetöteten *B. henselae* kam es zu einem deutlich verminderten Anstieg der VEGF-Induktion, obwohl diese Erreger ebenfalls Pilus-positiv waren. Ausschlaggebend scheint also nicht allein das Vorhandensein der Typ-4 Pili zu sein, sondern außerdem die Tatsache, dass lebende Bakterien für eine Infektion hinzugefügt werden, die in der Lage sind, die Induktion von VEGF aktiv zu triggern, das heißt z. B. über die hypothetische Sekretion bakterieller Proteine mittels dem Typ IV - Sekretionssystem. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Interaktion von *B. henselae* mit Endothelzellen zu einer Aktivierung des Typ IV - Sekretionssystems führt (157).

Eine Infektion mit sonifizierten *B. henselae* führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Der Erreger ließ sich jedoch auch durch mehrmaliges langes Sonifizieren nicht vollständig abtöten, wie die Sterilkontrollen zeigten. Dies könnte zu einer Verfälschung der Ergebnisse durch wenige überlebende Bakterien geführt haben.

4.4.2. Einfluss des Aktinskeletts auf die VEGF-Produktion

Es kann momentan noch nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die Infektion einer Wirtszelle mit *B. henselae* eine mitogene Aktivität induziert oder zu einer Stressantwort der epithelialen Zellen führt, die eine sekundäre Produktion vaskuloproliferativer Zytokine in Gang setzt. Unspezifische Stimuli, wie z. B. Ultraschall wurden bereits als Induktoren für eine IL-8- oder VEGF-Produktion bei verschiedenen Zelltypen identifiziert (146). Es wurde diskutiert, dass die Ultraschall-induzierte VEGF-Produktion ein unspezifischer Prozess sein könnte, der mit mechanischen Veränderungen im Zytoskelett einhergeht. Da bekannt ist, dass *B. henselae* bei der Bildung von Invasomen mit der Aktin-Polymerisation interagiert (40), ist es möglich, dass ein ähnlicher Mechanismus auch bei der *B. henselae*-induzierten VEGF-Produktion von Bedeutung ist. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wurde der Anstieg der VEGF-Produktion durch den Zusatz von Cytochalasin-D zu *B. henselae*-infizierten EA.hy 926 Zellen jedoch nicht beeinflusst. Dies zeigt, dass die Interaktion von *B. henselae* mit dem Aktinzytoskelett wahrscheinlich keine große Rolle in dem Prozeß der VEGF-Produktion spielt. Es könnte sich hierbei vielmehr um eine aktive Invasion einzelner

Bakterien handeln, einem im Gegensatz zur Invasombildung, bei der ganze Bakterienaggregate in die Wirtszellen aufgenommen werden, Aktin-unabhängigen Prozeß. Diese einzeln in die Zellen eindringenden Bakterien sind intrazellulär in kleinen Vakuolen vor allem perinukleär verteilt und deutlich häufiger zu sehen als Invasome (98). Ähnliche Aktin-unabhängige Prozesse konnten bereits nachgewiesen werden, z. B. bei *Actinobacillus actinomyceterncomitans* oder *Trypanosoma cruzi* (18, 150).

4.5. Neusynthese von VEGF nach *Bartonella henselae*-Infektion

Der Anstieg der VEGF-Spiegel nach einer *B. henselae*-Infektion kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Einerseits ist es möglich, dass die Wirtszellen durch die Interaktion mit *B. henselae* dazu angeregt werden, bereits synthetisiertes intrazellulär vorliegendes VEGF auszuschütten. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Expression des VEGF-Gens zuerst hochreguliert wird und nachfolgend das Protein neu synthetisiert und sezerniert wird. Einen Hinweis dafür gibt die vollständige Unterdrückung der VEGF-Produktion durch Modulation des Versuchsansatzes mittels Cycloheximid, einem potenten Inhibitor der Proteinbiosynthese. Die Ergebnisse zeigen, dass VEGF nach *B. henselae*-Infektion in der Tat neu synthetisiert wird. Diese Vermutung steht in Übereinstimmung mit der zeitlich vorhergehenden Induktion der VEGF-mRNA. Es kann spekuliert werden, dass dabei der Transkriptionsfaktor HIF-1 α beteiligt ist, da bekannt ist, dass HIF-1 α der Regulator für VEGF und andere vaskuläre Faktoren darstellt (63).

Durch die immunhistochemische Untersuchung der Gewebebiopsien von Patienten mit BA und BP, die in Bartonella-spezifischen PCRs positiv für *B. henselae*-DNA waren, konnte nachgewiesen werden, dass es auch *in vivo* zu einem deutlichen Anstieg der VEGF-Spiegel kommt (97). Diese Beobachtung untermauert die Bedeutung von VEGF in der *B. henselae*-Infektion und zeigt, dass VEGF genau wie beim Kaposi-Sarkom (121) auch bei BA und BP eine herausragende Rolle spielt.

4.6. Die Rolle weiterer vaskuloproliferativer Zytokine in der *Bartonella henselae*-Infektion

Die verschiedenen Schritte der Angiogenese, die eine Endothelzellmigration und -proliferation und anschließend die Ausbildung eines neuen Lumens und die Synthese der extrazellulären Matrix beinhalten, sind streng reguliert und bedürfen mehr als eines angiogenetischen Faktors für jede Stufe. Neben VEGF spielen eine Vielzahl anderer Faktoren, wie zum Beispiel Angiopoetine, Interleukine, Fibroblastäre Wachstumsfaktoren oder Ephrine eine wichtige Rolle in der Regulation der Angiogenese (12, 26, 68, 193, 196). In den konditionierten Zellkulturüberständen ließ sich neben VEGF auch ein Vorhandensein anderer Faktoren indirekt nachweisen. Der Einsatz von VEGF-neutralisierenden Antikörpern im Proliferationsassay supprimierte die Endothelzellproliferation auf ca. 50%. Dies führt zu der Annahme, dass (I) VEGF der wichtigste Faktor und (II) noch weitere Faktoren in den Prozess der *B. henselae*-induzierten Angiogenese involviert sind. In der Vergangenheit wurden bereits einige Zytokine beschrieben, die vaskuloproliferative Eigenschaften haben, die denen des VEGFs ähnlich sind, wie z. B. IL-8, Tumornekrosefaktor α (TNF- α), und der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (196). Möglicherweise spielen auch andere Faktoren der VEGF Familie, wie VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D eine Rolle.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch nachgewiesen werden, dass das Zytokin IL-8 durch eine *B. henselae*-Infektion ebenfalls induziert wird. Die Infektion mit *B. henselae* führte sowohl in epithelialen Zellen (EA.hy 926) als auch in den Endothelzellen (HUVECs) selbst zu einer IL-8 Induktion, im Gegensatz zu VEGF, welches nur in Zellen mit epithelialen Anteilen induziert werden konnte. In den Endothelzellen war der zu verzeichnende IL-8 Anstieg sogar höher als in den Zellen mit epithelialen Anteilen. Der Grund warum es bei HUVECs zu einem weitaus deutlicheren Anstieg der IL-8 Produktion kommt, ist noch unklar.

Es ist wahrscheinlich, dass IL-8 eines der Zytokine ist, die zu dem vaskuloproliferativen Effekt der konditionierten Zellkulturüberstände auf die Endothelzellen auch nach Blockade durch VEGF-neutralisierende Antikörper beitragen. Da nach *B. henselae*-Infektion das Zytokin IL-8 aber auch insbesondere in Endothelzellen nachgewiesen werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass der Erreger auf diesem Weg direkt vaskuloproliferativ wirkt, ohne den Umweg über die Epithelzellen gehen zu müssen.

Die Rolle anderer vaskuloproliferativer Zytokine, wie Angiopoetin, TNF- α oder bFGF bei Infektionen mit *B. henselae* muss noch weiter untersucht werden, da bekannt ist, dass diese Faktoren eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielen (193). Dies könnte z. B. über den Einsatz sogenannter Gene-Chip-Arrays erfolgen.

4.7. Induktion einer Endothelzellproliferation durch *Bartonella henselae*: „paracrinic loop model“

Aus den hier gezeigten Ergebnissen lässt sich das folgende hypothetische Modell ableiten. Nach der Übertragung des Erregers *B. henselae* durch Katzenkratzer oder -bisse, oder möglicherweise auch Katzenflöhe gelangt das Bakterium in den Blutkreislauf des Menschen. Von hier aus schreitet die Infektion fort. Wahrscheinlich gelangt *B. henselae* aus der Blutbahn zunächst in die die Blutgefäße umgebenden Endothelzellen. In diesen findet der Erreger die geeigneten Bedingungen, um sich zu vermehren und sein Überleben zu sichern.

Wie aus dieser Arbeit vermutet werden kann, schafft es *B. henselae*, seine eigenen Lebensbedingungen so optimal wie möglich zu gestalten. Da nach dem Eindringen des Bakteriums aus dem Blutkreislauf in den Körper die Endothelzellen die geeigneten Wirtszellen für die Vermehrung des Erregers darstellen, werden diese durch das Bakterium zur Proliferation angeregt. Dieser Mechanismus konnte im Rahmen dieser Arbeit beschrieben werden.

Die Zielzellen nach einer Infektion mit *B. henselae* könnten die in Gefäßnähe liegenden Epithelzellen oder Makrophagen sein, die VEGF produzieren, da weder Endothelzellen, noch glatte Muskelzellen durch *B. henselae* zu einer VEGF-Produktion angeregt werden konnten.

Dieses aus Epithelzellen stammende VEGF weist eine starke biologische Aktivität auf: Der durch Infektionsexperimente gewonnene und VEGF enthaltende Zellkulturüberstand bewirkt eine deutliche Proliferation der Endothelzellen, wie durch Proliferationsassays gezeigt werden konnte.

In den früher beschriebenen Modellen konnte durch eine Kokultivierung von HUVECs mit *B. henselae* ein zwei- bis dreifacher Anstieg der Proliferationsrate der Endothelzellen erzielt werden. Im Gegensatz dazu resultiert das in dieser Arbeit beschriebene Modell der Endothelzellstimulation mit konditioniertem Zellkulturüberstand in 25- bis 70-fach erhöhten Proliferationsraten. Aufgrund der

bemerkenswert höheren Stimulationsindices lässt sich annehmen, dass dieser Mechanismus äußerst wichtig für das Verständnis der Entstehung von *B. henselae*-induzierten Vaskuloproliferationen bei BA und BP ist.

Diese Form der Endothelzellproliferation stellt möglicherweise einen neuen Pathomechanismus dar, der sich von den zuvor beschriebenen unterscheidet und für Bakterien bis jetzt einzigartig ist. Aus unseren Beobachtungen lässt sich schließen, dass die Vaskuloproliferationen, die nach einer *B. henselae*-Infektion entstehen können, nicht auf die direkte Wirkung der Bakterien auf die Endothelzellen zurückzuführen sind, sondern auf die Erreger-bedingte VEGF-Produktion des umliegenden Epithels. Wir haben das zugrunde liegende Modell als „paracrine loop model“ bezeichnet. Hierzu passt auch die Beobachtung, dass mit *Bartonella bacilliformis* infizierte Endothelzellen selbst nicht zur Angiogenese beitragen. Vielmehr setzen die infizierten Zellen Signale frei, die wiederum andere Endothelzellen dazu stimulieren, zu der Neuentstehung von Kapillaren beizutragen. Einer der Stimuli hierbei könnte VEGF sein (185).

Der ökologische Benefit, der durch die indirekte Stimulation dieser Endothelzellen mittels VEGF und der daraus resultierenden Proliferation für *B. henselae* entsteht, liegt darin, dass sich der Erreger selbst verbesserte Wachstums- und Lebensbedingungen schafft (98). Die Fähigkeit von *B. henselae*, das Wachstum von vaskulären Tumoren zu induzieren, scheint für das Bakterium insofern passend zu sein, als eine größere Anzahl der nötigen Wirtszellen, die klinisch als Tumor imponieren, bessere Wachstumsbedingungen für die Tumor-induzierenden Bakterien bereitstellt. Durch die Induktion der VEGF-Produktion in BA und BP schafft sich *B. henselae* so offensichtlich einen optimierten Lebensraum. Passend zu dieser Hypothese konnte von Kirby und Nekorchuk nachgewiesen werden, dass *Bartonella henselae* die Apoptose von Endothelzellen inhibiert (101). Dies kann auf zwei Arten gedeutet werden: erstens als Vermeidung unspezifischer Verteidigungsstrategien der Wirtszelle gegen fakultativ intrazelluläre Erreger und zweitens als Strategie des Erregers, um die Zerstörung seines Lebensraumes zu verhindern.

Ein ähnlicher Mechanismus wurde für das für Pflanzen pathogene *Agrobacterium tumefaciens* beschrieben, das mit *B. henselae* phylogenetisch nahe verwandt ist. (31, 123). *Agrobacterium tumefaciens* schleust mit seinem Typ IV - Sekretionssystem T-DNA in die Pflanzenzellen ein, welche daraufhin Wachstumshormone (Auxine, Zytokine) produzieren, um das Wachstum der Pflanzenzellen anzuregen und dadurch

gute Wachstumsbedingungen für die Bakterien zu sichern. Ob das Typ IV - Sekretionssystem von *B. henselae* (156) ebenfalls an der Induktion der VEGF-Produktion der Wirtszellen beteiligt ist, konnte noch nicht nachgewiesen werden. Bislang gibt es jedoch keine Evidenz für das Vorliegen von etwas Vergleichbarem zur T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens*, noch konnte nachgewiesen werden, dass bakterielle DNA ins Humangenom der Wirtszelle integriert wird. Dies läßt sich auch daraus indirekt ableiten, dass es unter Antibiotikatherapie zur vollständigen Rückbildung der vaskuloproliferativen Tumoren kommt und nicht zu einer bestehenden malignen Transformation. Durchaus möglich wäre aber das Vorhandensein eines Proteins, das die Wirtszellen moduliert, vergleichbar dem *cagA* von *Helicobacter pylori* (82, 132).

4.8. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen erstmals, dass *B. henselae* zu einer Endothelzellproliferation führt, indem es die Produktion von VEGF in den umgebenden Zellen induziert. Hierbei scheint es sich um einen zweistufigen Prozess zu handeln, durch den sich der Erreger eine Verbesserung seines eigenen Lebensraumes schafft.

Von besonderer Bedeutung für die Zukunft ist somit (I) der Nutzen als angiogenetisches therapeutisches Agens, und (II) die mögliche Beteiligung bakterieller Pathogene an der Induktion anderer menschlicher Tumorerkrankungen.

Ein wichtiges Bindeglied zwischen den benignen tumorösen Erkrankungen BA und BP und malignen Tumoren ist mit Sicherheit die pathologische Angiogenese und die starke Vaskularisierung bei beiden Krankheitsbildern. Desweiteren gibt es große Analogien zwischen den Pathomechanismen von *A. tumefaciens*, welches Pflanzentumoren verursacht und der durch *B. henselae* hervorgerufenen BA. Das Wachstum solider Tumoren in Menschen, Tieren und Pflanzen hängt zu einem großen Teil von der Entstehung eines hochentwickelten Gefäßnetzwerkes ab, welches Tumorwachstum und -versorgung sicherstellt. Die Untersuchung solcher bakteriell verursachter Tumorerkrankungen könnte neue Einblicke in Tumorentstehung, pathologische Angiogenese und bakterielle Pathogenitätsfaktoren geben.

Überdies ist die Idee, neoangiogenetische Prozesse bakteriell zu induzieren, ein interessantes Konzept bei der Entwicklung neuer Therapieregime für Erkrankungen die mit Gefäßverschlüssen einhergehen, wie z.B. die Arteriosklerose. Dabei könnten z. B.

rekombinant hergestellte bakterielle Faktoren von *B. henselae* therapeutisch zum Einsatz kommen. Dies ist besonders interessant, weil Studien keine Erfolge bei alleinigem Einsatz von VEGF bei der Therapie der Arteriosklerose gezeigt haben (166). Von Vorteil wäre hier der Einsatz eines „angiogenetischen Cocktails“, in dem es zu einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren kommt, wie er in der vorliegenden Arbeit durch eine *B. henselae*-Infektion induziert wurde.

5. Zusammenfassung

Bei der pathologischen Angiogenese wirken viele verschiedene Faktoren zusammen und bewirken dadurch eine Proliferation und Migration der Endothelzellen, was zu der Entstehung neuer Blutgefäße führt. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Zytokin VEGF (193), das als ein sehr spezifischer proliferativer Faktor für Endothelzellen identifiziert wurde (112).

Die Rolle, die VEGF bei der Pathogenese vaskuloproliferativer Erkrankungen spielt, die durch *Bartonella henselae* induziert werden (bazilläre Angiomatose und bazilläre Peliose) (4), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Desweiteren wurden Untersuchungen zur genaueren Charakterisierung der bakteriellen Faktoren angestellt, die eine VEGF-Induktion bewirken.

Die vorliegende Dissertation lieferte folgende Ergebnisse:

1. Die *in vitro* Infektion mit *Bartonella henselae* führt zu keinem Anstieg der VEGF-Produktion in Endothelzellen (HUVEC).
2. Im Gegensatz dazu induziert *Bartonella henselae* in Zellen mit epithelialen Anteilen (EA.hy 926 und Hela 229 Zellen) einen signifikanten Anstieg der VEGF-Produktion.
3. Dieses in den Zellkulturüberstand sezernierte VEGF wird nach der Infektion durch die Wirtszellen neu synthetisiert.
4. Die Expression der „Pili“ spielt eine bedeutende Rolle bei der Induktion der VEGF-Produktion in den Wirtszellen.
5. Stimulation der Zellen mit hitzegetöteten *Bartonella henselae* bedingt eine verringerte VEGF-Produktion.
6. Der Mechanismus der VEGF-Induktion nach Infektion ist für *Bartonella henselae* – soweit untersucht – spezifisch und wird nicht durch andere Bakterien oder deren Bestandteile (*E. coli*, *Listerien*, LPS) ausgelöst.
7. Zellkulturüberstand der mit *Bartonella henselae* infizierten EA.hy 926 Zellen enthält biologisch aktives VEGF, das zu einer Proliferation von Endothelzellen (HUVECs) führt.

8. Die proliferierenden Endothelzellen stimulieren ihrerseits das Wachstum von *Bartonella henselae*.

Das in dieser Arbeit nachgewiesene Modell der durch *Bartonella henselae* parakrin induzierten Entstehung vaskuloproliferativer Erkrankungen beschreibt einen neuen zweistufigen Pathogenitätsmechanismus bakterieller Infektionserreger beim Menschen. In der ersten Stufe induziert *B. henselae* die Produktion von VEGF in epithelialen Zellen und damit parakrin ein Endothelzellwachstum, und schafft sich selbst damit in der zweiten Stufe eine Verbesserung seines eigenen Habitats mit günstigeren Wachstums- und Lebensbedingungen. Hierbei handelt es sich um einen fundamental neuen Aspekt in der Pathogenese bakterieller Infektionen und der Induktion menschlicher Tumoren.

6. Literaturverzeichnis

1. **Adal, K. A., Cockerell, C. J., and Petri, W. A. Jr.** 1994. Cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and other infections due to *Rochalimaea*. N. Engl. J. Med. **330**: 1509-1515.
2. **Aiello L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., Park, J. E., Nguyen, H. V., Aiello, L. M., Ferrara, N., and King, G. L.** 1994. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. N. Engl. J. Med. **331**: 1480-1487.
3. **Anderson, B., Sims, K., Regnery, R., Robinson, L., Schmidt, M. J., Goral, S., Hager, C., and Edwards, K.** 1994. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. J. Clin. Microbiol. **32**: 942-948.
4. **Anderson, B., and Neuman, M. A.** 1997. *Bartonella spp.* as emerging human pathogens. Clin. Microbiol. Rev. **10**: 203-219.
5. **Autenrieth, I.B., Tingle, A., Reske-Kunz, A., and Heesemann, J.** 1992. T-lymphocytes mediate protection against *Yersinia enterocolitica* in mice: characterization of murine T-cell clones specific for *Y. enterocolitica*. Infect Immun **60**: 1140-1149.
6. **Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I.** 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. FEBS Lett. **307**:97-101.
7. **Barleon, B., Hauser, S., Schollmann, C., Weindel, K., Marme, D., Yayon, A., and Weich, H. A.** 1994. Differential expression of the two VEGF receptors flt and KDR in placenta and vascular endothelial cells. J. Cell. Biochem. **54**: 56-66.

8. **Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H. A., Mantovani, A., and Marme, D.** 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* **87**: 3336-3343.
9. **Bass, J. W., Vincent, J. M., and Person, D. A.** 1997. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **16 (2)**: 163-179.
10. **Battermann, H. J., Peek, J. A., Loutit, J. S., Falkow, S., and Tompkins, L. S.** 1995. *Bartonella henselae* and *quintana* Adherence to and Entry into Cultured Human Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **63**: 4553-4556.
11. **Berger, T. G., and Koehler, J. E.** 1993. Bacillary Angiomatosis. *AIDS Clin. Rev.* **94**: 43-60.
12. **Betsholtz, C., Karlsson, L., and Lindahl, P.** 2001. Developmental role of platelet-derived growth factors. *Bioessays* **6**: 494-507.
13. **Böhm, I., Biwer, E., Walger, P., Uerlich, M., Welisar, P., and Bauer, R.** 1995. Die Bazilläre Angiomatose. *Dt. Ärztebl.* **92**: A-1916-1921 (Heft 27).
14. **Bohn, E., Heesemann, J., Ehlers, S., and Autenrieth, I. B.** 1994. Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **62**:3027-3032.
15. **Brenner, D. J., O'Connor, S. P., Winkler, H. H., and Steigerwalt, A. G.** 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 of *Rickettsiales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43 (4)** : 777-786.

16. **Brenner, D. J., Hollis, D. G., Moss, C. W., English, C. K., Hall, G. S., Vincent, J., and others.** 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 Bacillus), *Afipia broomeae* sp. nov., and Three Unnamed Genospecies. J. Clin. Microbiol. **29**: 2450-2460.
17. **Brenner, D. J., Rooney, J. A., Manzewitsch, P., and Regnery, R. L.** 1997. Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: Effects of Methods of Blood Collection and Handling. J. Clin. Microbiol. **35**: 544-547.
18. **Brisette, C. A., Fives, T. P.** 1999. *Actinobacillus actinomyceterncomitans* may utilize either actin-dependent or actin-independent mechanisms of invasion. Oral Microbiol. Immunol. **14**: 137-142.
19. **Brown, L. F., Yeo, K.-T., Berse, B., Yeo, T.-K., Senger, D. R., Dvorak, H. F., and Van de Water, L.** 1992. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. J. Exp. Med. **176**: 1375-1379.
20. **Burgess, A. W., and Anderson, B. E.** 1998. Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. Microb. Pathog. **25**: 157-164.
21. **Cainza, M. A., Granger, D. C., Wilson, K. H., Washington, M. K., Kordick, D. L., Frush, D. P., and Blichington R. B.** 1995. Etiology of Pulmonary Nodules in a Patient with Depressed Cell-Mediated Immunity. CID **20** (6): 1505-1511.
22. **Cannon, J. G., Tompkins, R. G., Gelfand, J. A., Michie, H. R., Stanford, G. G., van der Meer, J. W., Endres, S., Lonnemann, G., Corsetti, J., and Chernow, B.** 1990. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. J. Infect. Dis. **161**:79-84.

-
23. **Carithers, H. A.** 1985. Cat-scratch Disease. An Overview Based on a Study of 1,200 Patients. *AJDC* **139**: 1142-1133.
 24. **Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoecck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., and Nagy, A.** 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature (London)* **380**: 435-439.
 25. **Carmeliet, P., and Jain, R.K.** 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**: 249-257.
 26. **Carmeliet, P.** 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* **6 (3)**: 389-395.
 27. **Cejudo-Martin, P., Ros, J., Navasa, M., Fernandez, J., Fernandez-Varo, G., Ruiz-del-Arbol, L., Rivera, F., Arroyo, V., Rodes, J., and Jimenez, W.** 2001. Increased production of vascular endothelial growth factor in peritoneal macrophages of cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* **34**: 487-493.
 28. **Charnock-Jones, D. S., Sharkey, A. M., Boocock, C. A., Ahmed, A., Plevin, R., Ferrara, N., and Smith, S. K.** 1994. Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol. Reprod.* **51**: 524-530.
 29. **Chomel, B. B., Abbott, R. C., Kasten, R. W., Floyd-Hawkins, K. A., Kass, P. H., Glaser, C. A., Pedersen, N. C., and Koehler, J. E.** 1995. *Bartonella henselae* Prevalence in Domestic Cats in California: Risk Factors and Association between Bacteremia and Antibody Titers. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2445-2450.

-
30. **Chomel, B. B., Kasten, R. W., Floyd-Hawkins, K., Chi, B., Yamamoto, K., Roberts-Wilson, J., Gurfield, A. K., Abbott, R. C., Pedersen, N. C., and Koehler, J. E.** 1996. Experimental Transmission of *Bartonella henselae* by the Cat Flea. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1952-1956.
 31. **Christie, P. J., and Vogel, J. P.** 2000. Bacterial type IV secretion : conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **8**: 354-360.
 32. **Clarridge III, J. E., Raich, T. J., Pirwani, D., Simon, B., Tsai, L., Rodriguez-Barradas, M. C., Regnery, R., Zollo, A., Jones, D., and Rambo, C.** 1995. Strategy to Detect and Identify *Bartonella* Species in Routine Clinical Laboratory Yields *Bartonella henselae* from Human Immunodeficiency Virus-Positiv Patient and Unique *Bartonella* Strain from his Cat. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2107-2113.
 33. **Cockerell, C. J., Bergstresser, P. R., Myrie-Williams, C., Tierno, P. M.** 1990. Bacillary epitheloid angiomatosis occurring in an immunocompromised individual. *Arch. Dermatol.* **126**: 787-790.
 34. **Cockerell, C. J., and Friedman-Kien, A. E.** 1988. Epitheloid Angiomatosis and Cat Scratch Disease Bacillus. *Lancet* **88 (6)**: 1334-1335.
 35. **Cockerell, C. J., Whitlow, M. A., Webster, G. F., and Friedman-Kien, A. E.** 1987. Epitheloid Angiomatosis: a Distinct Vascular Disorder in Patients with the acquired immunodeficiency Syndrome or Aids-Related Complex. *Lancet* **87 (9)**: 654-656
 36. **Colville-Nash, P. R., and Willoughby, D. A.** 1997. Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential. *Mol. Med. Today*, Jan. 1997 : 14-23.

-
37. **Conley, T., Slater, L., and Hamilton, K.** 1994. *Rochalimaea* species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* **124**: 521-528.
 38. **Daly, J. S., Worthington, M. G., Brenner, D. J., Moss, C. W., Hollis, D. G., Weyant, R. S., Steigerwalt, A. G., Weaver, R. E., Daneshvar, M. J., and O'Connor, S. P.** 1993. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. Isolated from a Patient with Endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **3**: 872-881.
 39. **Debre, R., Lamy, M., Jammet, M. L., Costil, L., and Mozziconacci, P.** 1950. La maladie des griffes de chat. *Soc. Med. Hop. Paris* **66**: 76-79.
 40. **Dehio, C., Mayer, M., Berger, J., Schwarz, H., and Lanz, C.** 1997. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J. Cell. Sci.* **110**: 2141-2154.
 41. **Deiwick, J., and Hensel, M.** 1999. Regulation of virulence genes by environmental signals in *Salmonella typhimurium*. *Electrophoresis* **20**: 813-817.
 42. **Deroanne, C. F., Hajitou, A., Calberg-Bacq, C. M., Nusgens, B. V., and Lapiere, C. M.** 1997. Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* **57**: 5590-5597.
 43. **Desbaillets, I., Diserens, A.-C., de Tribolet, N., Hamou, M.-F., and Van Meir, E.** 1997. Upregulation of Interleukin 8 by Oxygen-deprived Cells in Glioblastoma Suggests a Role in Leukocyte Activation, Chemotaxis, and Angiogenesis. *J. Exp. Med.* **186** (8): 1201-1212.
 44. **De Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, L. T.** 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**: 989-991.

-
45. **Dolan, M. J., Wong, M. T., Regnery, R. L., Jorgensen, J. H., Garcia, M., Peters, J., and Drehner, D.** 1993. Syndrome of *Rochalimaea henselae* Adenitis Suggesting Cat Scratch Disease. *Annals of Internal Medicine* **118 (5)**: 331-338.
 46. **Drancourt, M., Birtles, R., Chaumentin, G., Vandenesch, F., Etienne, J., and Raoult, D.** 1996. New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet* **347**: 441-443.
 47. **Drancourt, M., and Raoult, D.** 1993. Proposed Tests for the Routine Identification of *Rochalimaea* Species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**: 710-713.
 48. **Dunn, M. W., Berkowitz, F. E., Miller, J. J., and Snitzer, J. A.** 1997. Hepatosplenic cat-scratch disease and abdominal pain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **16 (3)**: 269-270.
 49. **Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Feng, D., Brown, L. F., and Dcorak, A. M.** 1999. Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **237**: 97-132.
 50. **Edgell, C. J., McDonald, C. C., and Graham, J. B.** 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3734-3737.
 51. **Endres, S., van der Meer, J. W., and Dinarello, C. A.** 1987. Interleukin-1 in the pathogenesis of fever. *Eur. J. Clin. Invest* **17**:469-474.
 52. **Enholm, B., Paavonen, K., Ristimaki, A., Kumar, V., Gunji, Y., Klefstrom, J., Kivinen, L., Laiho, M., Olofsson, B., Joukov, V., Eriksson, U., and Alitalo, K.** 1997. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* **14**: 2475-2483.

-
53. **English, C. K., Wear, D. J., Margileth, A. M. Lissner, C. R., and Walsh, G. P.** 1988. Cat-Scratch Disease Isolation and Culture of the Bacterial Agent. *JAMA* **259**: 1347-1352.
 54. **Ferrara, N., Carvermoore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., Oshea, K. S., Powellbraxton, L., Hillan, K. J., and Moore, M. W.** 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature (London)* **380**: 439-442.
 55. **Ferrara, N., and Davis-Smyth, T.** 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18(1)**: 4-25.
 56. **Ferrara, N., and Henzel, W. J.** 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**: 851-858.
 57. **Finkenzeller, G., Sparacio, A., Technau, A., Marme, D., and Siemeister, G.** 1997. Sp 1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* **15**: 669-676.
 58. **Folkman, J.** 1996. Angiogenesis and tumor growth. *N. Engl. J. Med.* **334**: 921.
 59. **Folkman, J.** 1995. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* **333(26)**: 1757-1763.
 60. **Folkman, J.** 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* **82 (1)**: 4-6.
 61. **Folkman, J., and Haudenschild, C.** 1980. Angiogenesis in vitro. *Nature* **288**: 551-556.

-
62. **Folkman, J., and Shing, Y.** 1992. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267 (16)**: 10931-10934.
63. **Forsythe, J. A., Jiang, B.-H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L.** 1996. Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Mol. and Cell. Biol.* **16 (9)**: 4604-4613.
64. **Fournier, E., Virnbaum, D., and Borg, J. P.** 1997. Receptors for factors of the VEGF family. *Bull. Cancer* **84**: 397-403.
65. **Frater-Schroder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P., and Bohlen, P.** 1987. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**:5277-5281.
66. **Fretzayas, A., Tapratzi, P., Kavazarakis, E., and Sinaniotis, C.** 1993. Multiorgan involvement in systemic cat-scratch disease. *Scand. J. Infect. Dis.* **25**: 145-148.
67. **Fumarola, D., Giuliani, G., and Pece, S.**1996. Pathogenic mechanisms of *Bartonella henselae* infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **15**: 385-386.
68. **Gale, N. W., and Yancopoulos, G. D.** 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoetins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* **13**: 1055-1066.
69. **Garcia, F. U., Wojta, J., Broadley, K. N., Davidson, J. M., and Hoover, R. L.** 1990. *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells in vitro and is angiogenic in vivo. *Am. J. Pathol.* **136**: 1125-1135.
70. **Gilbert, D. N., Moellering, R. C., and Sande, M. A.** 1999. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy* (29th Edition).

-
71. **Gitay-Goren, H., Halaban, R., and Neufeld, G.** 1993. Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**: 702-709.
 72. **Glauser, M. P., Heumann, D., Baumgartner, J. D., and Cohen, J.** 1994. Pathogenesis and Potential Strategies for Prevention and Treatment of Septic Shock: An Update. *Clin. Infect. Dis.* **18**: 205-216.
 73. **Golden, S. E.** 1993. Hepatosplenic cat-scratch disease associated with elevated anti-*Rochalimaea* antibody titers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **12**: 868-871.
 74. **Gospodarowicz, D., Abraham, J. A., and Schilling, J.** 1989. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7311-7315.
 75. **Green, C. E., McDermott, M., Jameson, P. H., Atkins, C. L., and Marks, A. M.** 1996. *Bartonella henselae* Infection in Cats: Evaluation during Primary Infection, Treatment, and Rechallenge Infection. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1682-1685.
 76. **Grützkau, A., Krüger-Krasagakes, S., Baumeister, H., Schwarz, C., Kogel, H., Welker, P., Lippert, U., Henz, B. M., and Moller, A.** 1998. Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF 206. *Mol. Biol. Cell.* **9(4)**: 875-884.
 77. **Guptill, L., Slater, L., Wu, C., Lin, T., Glickman, L. T., Welch, D. F., and Hogenesch, H.** 1997. Experimental Infection of Young Specific Pathogen-Free Cats with *Bartonella henselae*. *JID* **176**: 206-216.
 78. **Haimerl, M., Tenter, A. M., Simon, K., Rommel, M., Hilger, J., and Autenrieth, I. B.** 1999. Seroprevalence of *Bartonella henselae* in cats in Germany. *J. Med. Microbiol.* **48**: 849-856.

-
79. **Hanahan, D., and Folkman, J.** 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364.
80. **Heizmann, W. R., Schalasta, G., Moling, G., und Pegoretti, S.** 1996. Katzenkratzkrankheit (*Bartonella henselae* Antikörper und Nukleinsäurenachweis bei regionaler Lymphadenopathie). *Dtsch. Med. Wschr.* **121**: 622-626.
81. **Heller, R., Artois, M., Xemar, V., De Briel, D., Gehin, H., Jaulhac, B., Monteil, H., and Piemont, Y.** 1997. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in Stray Cats. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1327-1331.
82. **Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., and Hatakeyama, M.** 2002. SHP-2 Tyrosine Phosphatase as an Intracellular Target of *Helicobacter pylori* CagA Protein. *Science* **295**: 683-686.
83. **Hilger, J.** 1999. Etablierung und Evaluation von DNA-Nachweismethoden und Immunhistologie zur Diagnostik von *Bartonella henselae* – Infektionen. Doktorarbeit aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg.
84. **Houck, K. A., Ferrara, N., Winter, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D. W.** 1991. The Vascular endothelial growth factor family – identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* **5**: 1806-1814.
85. **Ibelgrauf, H.** 1999. COPE - Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. Version 3. 1 <http://www.copewithcytokines.de/>.
86. **Ihler, G. M.** 1996. *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. *FEMS Microbiol. Lett.* **144**: 1-11.

-
87. **Jameson, P., Green, C., Regnery, R., Dryden, M. Marks, A., Brown, J., Cooper, J., Glaus, B., and Greene, R.** 1995. Prevalence of *Bartonella henselae* Antibodies in Pet Cats throughout Regions of North America. *JID* **172**: 1145-1149.
 88. **Jiang, B. H., Agani, F., Passaniti, A., and Semenza G. L.** 1997. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: Involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.* **57**: 5328-5335.
 89. **Joukov, V., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Pajusola, K., Olofsson, B., Kumar, V., Eriksson, U., and Alitalo, K.** 1997. Vascular Endothelial Growth Factors VEGF-B and VEGF-C. *J. Cell. Physiol.* **173** (2): 211-215.
 90. **Jung, H. C., Eckmann, L., Yang, S. K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka, W. E., and Kagnoff, M. F.** 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* **95**:55-65.
 91. **Jussila, L., and Alitalo, K.** 2002. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol. Rev.* **82** (3): 673-700.
 92. **Jussila, L., Valtola, R., Partanen, T. A., Salven, P., Heikkilae, P., Matikainen, M. T., Renkonen, R., Kaipainen, A., Detmar, M., Tschachler, E., Alitalo, R., and Alitalo, K.** 1998. Lymphatic endothelium and Kaposi's Sarkoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3. *Cancer Res.* **58**: 1599-1604.
 93. **Kagnoff, M. F., and Eckmann, L.** 1997. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Invest.* **100**: 6-10.

-
94. **Kampik, D., Schulte, R., and Autenrieth, I. B.** 2000. *Yersinia enterocolitica* Invasin Protein Triggers Differential Production of Interleukin-1, Interleukin-8, Monocyte Chemoattractant Protein 1, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Tumor Necrosis Factor Alpha in Epithelial Cells: Implication for Understanding the Early Cytokine Network in *Yersinia* Infections. *Infect. Immun.* **68 (5)**: 2484-2492.
95. **Katoh, O., Tauchi, H., Kawaishi, K., Kimura, A., and Satow, Y.** 1995. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.* **55**: 5687-5692.
96. **Kemper, C. A., Lombard, C. M., Deresinski, S. C., and Tompkins, L. C.** 1990. Visceral Bacillary Epitheloid Angiomatosis: Possible Manifestations of Disseminated Cat Scratch Disease in the Immunocompromised Host: A Report of Two Cases. *The American Journal of Medicine* **89**: 216-222.
97. **Kempf, V. A. J., Volkmann, B., Schaller, M., Sander, C. A., Alitalo, K., Rieß, T., and Autenrieth, I. B.** 2001. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell. Microbiol.* **3(9)**:623-632.
98. **Kempf, V. A. J., Schaller, M., Behrendt, S., Volkmann, B., Aepfelbacher, M., Cakman, I., und Autenrieth, I. B.** 2000. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cellular Microbiology* **2**: 1-12.
99. **Keyt, B. A., Nguyen, H. V., Berleau, E. E., Duarte, C. M., Park, J., Chen, H., and Ferrara, N.** 1996. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors – generation of receptor-selective VEGF variants by site directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **271**: 5638-5646.

-
100. **Kim, S. J., Uehara, H., Karashima, T., Mccarty, M., Shih, N., and Fidler, I. J.** 2001. Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice. *Neoplasia* **3** (1): 33-42.
 101. **Kirby, J. E., and Nekorchuk, D. M.** 2002. *Bartonella*-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 4656-4661.
 102. **Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., DiPietro, L. A., Elnor, V. M., Elnor, S. G., and Strieter, R. M.** 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**:1798-1801.
 103. **Koehler, J. E., Glaser, C. A., and Tappero, J. W.** 1994. *Rochalimaea henselae* Infection (A New Zoonosis With the Domestic Cat as Reservoir). *JAMA* **271**: 531-535-
 104. **Koehler, J. E., LeBoit, P. E., Egbert, B. M., and Berger, T. G.** 1988. Cutaneous Vascular Lesions and Disseminated Cat-Scratch Disease in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) and AIDS-Related Complex. *Annals of Internal Medicine* **109**: 449-455.
 105. **Koehler, J. E., Quinn, F. D., Berger, T. G., LeBoit, P. E., and Tappero, J. W.** 1992. Isolation of *Rochalimaea* Species from Cutaneous and Osseous Lesions of Bacillary Angiomatosis. *N.Engl. J. Med.* **327**: 1625-1631.
 106. **Koesling, J., Aebischer, T., Falch, C., Schuelein, R., and Dehio, C.** 2001. Cutting Edge: Antibody-Mediated Cessation of Hemotropic Infection by the Intraerythrocytic Mouse Pathogen *Bartonella grahamii*. *J. Immunol.* **167**: 11-14.
 107. **Kordick, D. L., Wilson, K. H., Sexton, D. J., Hadfield, T. L., Berkhoff, H. A., and Breitschwerdt, E. B.** 1995. Prolonged *Bartonella* Bacteremia in Cats Associated with Cat-Scratch Disease Patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3245-3251.

-
108. **Krieg, A.** 1961. Grundlagen der Insektenpathologie; Viren-, Rickettsien- und Bakterien-Infektionen (Steinkopff, Darmstadt).

 109. **LaScola, B., and Raoult, D.** 1999. Culture of Bartonella quintana and Bartonella henselae from human samples: a 5-year experience (1993-1998). *J. Clin. Microbiol.* **37 (6)**: 1899-1905.

 110. **LeBoit, P. E., Berger, T. G., Egbert, B. M., Beckstead, J. H., Yen, B., and Stoler, M. H.** 1989. Bacillary Angiomatosis (The Histopathology and Differential Diagnosis of a Pseudoneoplastic Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus Disease). *Am. J. Surg. Pathol.* **13 (11)**: 909-920.

 111. **LeBoit, P. E., Berger, T. G., Egbert, B. M., Yen, B., Stoler, M. H., Bonfiglio, T. A., Strauchen, J. A., English, C. G., and Wear, D. J.** 1988. Epitheloid Haemangioma-like Vascular Proliferation in AIDS: Manifestation of Cat Scratch Disease Bacillus Infection. *Lancet* **88 (4)**: 960-963.

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

 113. **Lewis, D. W., and Tucker, S. H.** 1986. Central nervous system involvement in cat scratch disease. *Pediatrics* **77**: 714-721.

 114. **Liu, Y. X., Cox, S. R., Morita, T., and Kourembanas, S.** 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells – identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* **77**: 638-643.

-
115. **Lucey, D., Dolan, M. J., Moss, C. W., Garcia, M., Hollis, D. C., Wegner, S., Morgan, G., Almeida, R., Leong, D., Greisen, K. S., Welch, D. S., and Slater, L. N.** 1992. Relapsing Illness Due to *Rochalimaea henselae* in Immunocompetent Hosts: Implication for Therapy and New Epidemiological Associations. *CID* **14**: 638-688.
 116. **Maeno, N., Oda, H., Yoshiie, K., Wahid, M. R., Fumiura, T., and Matayoshi, S.** 1999. Live *Bartonella henselae* enhances endothelial cell proliferation without direct contact. *Microb. Pathog.* **27**: 419-427.
 117. **Maher, E. R., and Kaelin, W. G. Jr.** 1997. von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore)* **76**: 381-391.
 118. **Margileth, A. M.** 1993. Cat scratch disease. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.* **8**: 1-21.
 119. **Margileth, A. M., Wear, D. J., and English, C. K.** 1987. Systemic cat scratch disease: report of patients with prolonged or recurrent severe bacterial infection. *Infect. Dis.* **155**: 390-402.
 120. **Marshall, G. D. Jr., Agarwal, S. K., Lloyd, C., Cohen, L., Henninger, E. M., and Morris, G. J.** 1998. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav. Immun.* **12**:297-307.
 121. **Masood, R., Cai, J., Zheng, T., Smith, D.L., Naidu, Y., and Gill, P.S.** 1997. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* **94**: 979-984.
 122. **Massei, F., Massimetti, M., Messina, F., Macchia, P., and Maggiore, G.** 2000. *Bartonella henselae* and inflammatory bowel disease. *Lancet* **356**: 1245-1246.
 123. **Matthysse, A. G.** 1987. Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **169**: 313-323.

-
124. **Maurin, M., Roux, V., Stein, A., Ferrier, F., Viraben, R., and Raoult, D.** 1994. Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16 S rRNA gene sequencing, and pulsedfield gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with Bacillary angiomatosis. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1166-1171.
125. **Meyer, M., Clauss, C., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Büttner, M., Rziha, H.-J., and Dehio, C.** 1999. A novel vascular endothelial growth factor encoded by orf-virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* **18**: 363-374.
126. **Mohle-Boetani, J. C., Koehler, J. E., Berger, T. G., LeBoit, P. E., Kemper, C. A., Reingold, A. L., Plikaytis, B. D., Wenger, J. D., and Tappero, J. W.** 1996. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus: clinical characteristics in a case-control study. *Clin. Infect. Dis.* **22**: 794-800.
127. **Monteil, R. A., Michiels, J. F., Hofman, P., Saint, P. M., Hitzig, C., Perrin, C., and Santini, J.** 1994. Histological and ultrastructural study of one case of oral bacillary angiomatosis in HIV disease and review of the literature. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.* **30B**: 65-71.
128. **Morii, K., Tanaka, R., Washiyama, K., Kumanishi, T., and Kuwano, R.** 1993. Expression of vascular endothelial growth factor in capillary hemangioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194 (2)**: 749-755.
129. **Müller, H. E.** 1992. *Rochalimaea henselae*: der Erreger von bakterieller Angiomatose, Peliosis hepatis und Septikämie. *Münch. Med. Wschr.* **134**: 741-743.

-
130. **Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z.** 1999. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptors. *FASEB* **13**: 9-22.
131. **O'Connor, S. P. , Dorsch, M., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J., and Stackebrandt, E.** 1991. 16S rRNA Sequences of *Bartonella bacilliformis* and Cat Scratch Disease Bacillus Reveal Phylogenetic Relationship with the Alpha-2 Subgroup of the Class Proteobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2144-2150.
132. **Odenbreit, S., Püls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., and Haas, R.** 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Gastric Epithelial Cells by Type IV Secretion. *Science* **287**:1497-1500.
133. **Palmari, J., Teyssie, N., Dussert, C., and Raoult, D.** 1996. Image cytometry and topographical analysis of proliferation of endothelial cells in vitro during *Bartonella (Rochalimaea)* infection. *Anal. Cell. Pathol.* **11**: 13-30.
134. **Panyutich, E. A., Said, J. W., and Miles, S. A.** 1998. Infection of primary dermal microvascular endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *AIDS* **12**: 467-472.
135. **Perkocha, L. A., Geaghan, S. M., Yen, T. S. B., Nishimura, S. L., Chan, S. P., Garcia-Kennedy, R., Honda, G., Stoloff, A. C., Klein, H. Z., Goldman, R. L., van Meter, S., Ferrel, L. D., and LeBoit, P. E.** 1990. Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatis in association with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **323**: 1581-1586.
136. **Philpott, D. J., Yamaoka, S., Israel, A., and Sansonetti, P. J.** 2000. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J. Immunol.* **165**: 903-914.
137. **Plate, K. H., and Warnke, P. C.** 1997. Vascular endothelial growth factor. *J. Neuro-Oncology* **35**: 365-372.

-
138. **Ragno, S., Romano, M., Howell, S., Pappin, D. J., Jenner, P. J., and Colston, M. J.** 2001. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology* **104**: 99-108.
139. **Raoult, D., Fournier, P. E., Drancourt, M., Marrie, T. J., Etienne, J., Cosserat, J., Cacoub, P., Poinsignon, Y., Leclercq, P., and Sefton, A. M.** 1996. Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. *Ann. Intern. Med.* **125**: 646-652.
140. **Raoult, D., Drancourt, M., Carta, A., and Gastaut, J. A.** 1994. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* isolation in patients with chronic adenopathy, lymphopenia, and a cat. *Lancet* **343**: 977.
141. **Regnery, R. L., Anderson, B. E., Clarridge III, J. E., Rodriguez-Barradas, M. C., Jones, D. C., and Carr, J. H.** 1992. Characterization of a Novel *Rochalimaea* Species, *R. henselae* sp. nov., Isolated from the Blood of a Febrile, Human Immunodeficiency Virus-Positive Patient. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 265-274.
142. **Regnery, R., Childs, J. E., and Koehler, J. E.** 1995. Infections Associated with *Bartonella* Species in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. *CID.* **21** (Suppl 1): 94-98.
143. **Regnery, R., Martin, M., and Olson, J.** 1992. Naturally occurring "*Rochalimaea henselae*" infection in domestic cat. *Lancet* **340**: 557-558.
144. **Regnery, R. L., Olson, J. B., Perkins, B. A., and Bibb, W.** 1992. Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* **339**: 1443-1445.
145. **Regnery, R., and Tappero, J.** 1995. Unraveling Mysteries Associated with Cat-Scratch Disease, Bacillary Angiomatosis, and Related Syndromes. *EID* **1**: 16-21

-
146. **Reher, P., Doan, N., Bradnock, B., Meghji, S., and Harris, M.** 1999. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine* **11**: 416-423.
147. **Relman, D. A., Loutit, J. S., Schmidt, T. M., Falkow, S., and Tompkins, L. S.** 1990. The Agent of Bacillary Angiomatosis – An Approach to the Identification of Uncultured Pathogens. *N. Engl. J. Med.* **323**: 1573-1580.
148. **Ricketts, W.** 1949. Clinical manifestations of Carrions's disease. *Arch. Intern. Med.* **84**: 751-781.
149. **Risau, W.** 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature (London)* **386**: 671-674
150. **Rodriguez, A., Samoff, E., Rioult, M. G., Chung, A., and Andrews, N. W.** 1996. Host cell invasion by *Trypanosomes* requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J. Cell. Biol.* **134**: 349-362.
151. **Rodriguez-Barradas, M. C., Bandres, J. C., Hamill, R. J., Clarridge III, J. E., Baughin, R. E., and Rossen, R. D.** 1995. In Vitro Evaluation of the Role of Humoral Immunity against *Bartonella henselae*. *Infect. Immun.* **63**: 2367-2370.
152. **Rudikoff, D., Phelps, R. G., Gordon, R. E., and Battone, E. J.** 1989. Acquired immunodeficiency syndrome-related bacillary vascular proliferation (epitheloid angiomatosis) : rapid response to erythromycin therapy. *Arch Dermatol.* **125**: 706-707.
153. **Ryuto, M., Ono, M., Izumi, H., Yoshida, S., Weich, H. A., Kohno, K., and Kuwano, M.** 1996. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells – possible roles of SP-1. *J. Biol. Chem.* **271**: 28220-28228.

-
154. **Sander, A., Bühler, C., Pelz, K., v.Gramm, E., and Brecht, W.** 1997. Detection and Identification of Two *Bartonella henselae* Variants in Domestic Cats in Germany. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 584-587.
155. **Sander, A., Kaliebe, T., und Brecht, W.** 1996. *Bartonella (Rochalimaea)* – Infektionen: Katzenkratzkrankheit und Bazilläre Angiomatose. *Dtsch. Med. Wschr.* **121**: 65-69.
156. **Schmiederer, M., and Anderson, B.** 2000. Cloning, sequencing, and expression of three *Bartonella henselae* genes homologous to the *Agrobacterium tumefaciens* VirB region. *DNA Cell. Biol.* **19**: 141-147.
157. **Schmiederer, M., Arcenas, R., Widen, R., Valkov, N., and Anderson, B.** 2001. Intracellular Induction of the *Bartonella henselae* virB Operon by Human Endothelial Cells. *Infect. Immun.* **69**: 6495-6502.
158. **Schneider, T., Ullrich, R., Schmitt-Graff, A., Bergs, C., Reiterer, L., Dissmann, T., Zeitz, M., and Riecken E. O.** 1993. Bacillary angiomatosis in a German patient with AIDS. *Clin. Invest.* **72**: 50-54.
159. **Schoppmann, S. F., Birner, P., Stöckl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., and Kerjaschki, D.** 2002. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* **161 (3)**: 947-956.
160. **Schouls, L. M., van de Pol, I., Rijpkema, S. G. T., and Schot, C. S.** 1999. Detection and Identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, and *Bartonella* Species in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2215-2222.
161. **Schulte, R., and Autenrieth, I. B.** 1998. *Yersinia enterocolitica* – induced interleukin-8 secretion by human intestinal epithelial cells depends on cell differentiation. *Infect. Immun.* **66**: 1216-1224.

-
162. **Schulte, R., Grassl, G. A., Preger, S., Fessele, S., Jacobi, C. A., Schaller, M., Nelson, P. J., and Autenrieth, I. B.** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB* **14**: 1471-1484.
163. **Schwartzman, W. A., Patnaik, M., Barka, N. E., and Peter, J. B.** 1994. *Rochalimaea* Antibodies in HIV-associated neurologic disease. *Neurology* **44**: 1312-1316.
164. **Schwartzman, W. A.** 1992. Infections Due to *Rochalimaea*: The Expanding Clinical Spectrum. *CID* **15**: 893-902.
165. **Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E.** 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature (London)* **359**: 843-845.
166. **Sim, E. K., Zhang, L., Shim, W. S., Lim, Y. L., and Ge, R.** 2002. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *J. Card. Surg.* **17(4)**: 350-354.
167. **Slater, L. N., Welch, D. F., Hensel, D., and Coody, D. W.** 1990. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N. Engl. J. Med.* **323**: 1587-1593.
168. **Slater, L. N., Welch, D. F., Min, K.-W.** 1992. *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. *Arch. Intern. Med.* **152**: 602-606.
169. **Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., and Glagsbrun, M.** 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92**: 735-745.

-
170. Spach, D. H., Kanter, A. S., Daniels, N. A., Nowowiejski, D. J., Larson, A. M., Schmidt, R. A., Swamimathan, B., and Brenner, D. J. 1995. *Bartonella (Rochalimaea)* Species as a Cause of Apparent „Culture-Negative“ Endocarditis. *CID* **20**: 1044-1047.
171. Spach, D. H., Kanter, A. S., Dougherty, M. J., Larson, A. M., Coyle, M. B., Brenner, D. J., Swaminathan, B., Matar, G. M., Welch, D. F., Root, R. K., and Stamm, W. E. 1992. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* Bacteremia in inner-city Patients with chronic alcoholism. *N. Engl. J. Med.* **332**: 424-428.
172. Stadnyk, A. W. 1994. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J.* **8**:1041-1047.
173. Stein, A., and Raoult, D. 1995. Return of Trench Fever. *Lancet* **345**: 450-451.
174. Stoler, M. H., Bonfoglio, T. A., Steigbigel, R. T., and Pereira, M. 1983. An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Amer. J. Clin. Pathol.* **80**: 714-718.
175. Suzuki, H., Seto, K., Shinoda, J., Mori, M., Ishimura, Y., Suematsu, M., and Ishii, H. 1999. Paracrine upregulation of VEGF receptor mRNA in endothelial cells by hypoxia-exposed hep G2 cells. *Am. J. Physiol.* **76 (1 Pt 1)**: G92-97.
176. Takahashi, T., Shirasawa, T., Miyake, K., Yahagi, Y., Maruyama, N., Kasahara, N., Kawamura, T., Matsumura, O., Mitarai, T., and Sakai, O. 1995. Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: FLT-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**: 218-226.
177. Tappero, J. W., Koehler, J. E., Berger, T. G., Cockerell, C. J., Lee, T-H., Bush, M. P., Stites, D. P., Mohle-Boetani, J. C., Reingold, A. L., and LeBoit, P. E. 1993. Bacillary Angiomatosis and Bacillary Splenitis in Immunocompetent Adults. *Annals of Internal Medicine* **118 (5)**: 363-365.

-
178. **Tappero, J. W., Mohle-Boetani, J. C., Koehler, J. E., Swaminathan, B., Berger, T. G., LeBoit, P. E., Smith, L. L., Wenger, J. D., Pinner, R. W., Kemper, C. A., et. al.** 1993. The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis. *JAMA* **269**: 770-775.
179. **Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D., and Bohlen, P.** 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**: 1579-1586.
180. **Tischer, E., Gospodarowicz, D., Mitchell, R., Silva, M., Schilling, G., Lau, K., Crisp, T., Fiddes, J. C., and Abraham, J. A.** 1989. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**: 1198-1206.
181. **Tompkins, L. S.** 1997. Of Cats, Humans and *Bartonella*. *N.Engl. J. Med.* **337** (26): 1916-1917.
182. **Vaisman, N., Gospodarowicz, D., and Neufeld, G.** 1990. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **265**: 19461-19466.
183. **van Der Flier, M., Coenjaerts, F., Kimpen, J.L., Hoepelman, A.M., and Geelen, S.P.** 2000. *Streptococcus pneumoniae* induces secretion of vascular endothelial growth factor by human neutrophils. *Infect. Immun.* **68**: 4792-4794.
184. **Vanmeir, E. G., Polverini, P. J., Chazin, V. R., Huang, H. J. S., Detribolet, N., and Cavenee, W. K.** 1994. Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat. Genet.* **8**: 171-176.
185. **Verma, A., Davis, G. E., and Ihler, G. M.** 2001. Formation of stress fibres in human endothelial cells infected with *Bartonella bacilliformis* is associated with altered morphology, impaired migration and defects in cell morphogenesis. *Cell. Microbiol.* **3**: 169-180.

-
186. **Wear, D. J., Margileth, A. M., Hadfield, T. L., Fisch, G. W., Schlagel, C. J., and King, F. M.** 1983. Cat scratch disease: a bacterial infection. *Science* **221**: 1403-1405.
187. **Webster, G. F., Cockerell, C. J., and Friedman-Kien, A. E.** 1992. The clinical spectrum of bacillary angiomatosis. *Br. J. Dermatol.* **126**: 535-541.
188. **Weindel, K., Marmé, D., and Weich, H. A.** 1992. AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma Cells in Culture Express Vascular Endothelial Growth Factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183 (3)**: 1167-1174.
189. **Welch, D. F., Pickett, D. A., Slater, L. N., Steigerwalt, A. G., and Brenner, D. J.** 1992. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a Cause of Septicemia, Bacillary Angiomatosis, and Parenchymal Bacillary Peliosis. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 275-280.
190. **Wong, A. K., Alfert, M., Castrillon, D. H., Shen, Q., Holash, J., Yancopoulos, G. D., and Chin, L.** 2001. Excessive tumor-elaborated VEGF and its neutralization define a lethal paraneoplastic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98 (13)**: 7481-7486.
191. **Wong, M. T., Dolan, M. J., Lattuada, C. P. Jr., Regnery, R. L., Garcia, M. L., Mokulis, E. C., LaBarre, R. A., Ascher, D. P., Delmar, J. A., Kelly, J. W., Leigh, D. R., McRae, A. C., Reed, J. B., Smith, R. E., and Melcher, G. P.** 1995. Neuroretinitis, Aseptic Meningitis, and Lymphadenitis Associated with *Bartonella (Rochalimaea) henselae* Infection in Immunocompetent Patients and Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *CID* **21**: 352-360.
192. **Yamaoka, Y., Kwon, D. H., and Graham, D. Y.** 2000. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7533-7538.

-
193. **Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., and Holash, J.** 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**: 242-248.
194. **Yang, X. J., and Cepko, C. L.** 1996. Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J. Neurosci.* **16**:6089-6099.
195. **Yang, R., Thomas, G. R., Bunting, S., Ko, A., Ferrara, N., Keyt, B., Ross, J., and Jin, A.** 1996. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **27(6)**: 838-844.
196. **Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H., and Kuwano, M.** 1997. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol. Cell Biol.* **17**:4015-4023
197. **Zangwill, K. M., Hamilton, D. H., Perkins, B. A., Regnery, R. L., Plikaytis, B. D., Hadler, J. L., Carter, M. L., and Wenger, J. D.** 1993. Cat Scratch Disease in Connecticut. *N. Engl. J. Med.* **329**: 8-13.
198. **Zbinden, R., Hochli, M., and Nadal, D.** 1995. Intracellular Location of *Bartonella henselae* Cocultivated with Vero Cells and used for an Indirect Fluorescent-Antibody-Test. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2**: 693-695.
199. **Zetter, B. R.** 1998. Angiogenesis and Tumor Metastasis. *Annu. Rev. Med.* **49**: 407-424.
200. **Zofel, P.** 1985. Statistik in der Praxis. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
201. **Zysk, G., Bejo, L., Schneider-Wald, B. K., Nau, R., and Heinz, H.** 2000. Induction of necrosis and apoptosis of neutrophil granulocytes by *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Exp. Immunol.* **122**: 61-66.

7. Abkürzungen

| | |
|--------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| A. bidest. | zweifach destilliertes Wasser |
| AIDS | acquired immuno-deficiency syndrome |
| Ak | Antikörper |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BA | Bazilläre Angiomatose |
| <i>B. henselae</i> | <i>Bartonella henselae</i> |
| bp | Basenpaare |
| BP | Bazilläre Peliose |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| C | Celsius |
| ca. | circa |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| cDNA | copy desoxyribonucleid acid |
| CHX | Cycloheximid |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| cpm | counts per minute |
| CSD | cat scratch disease |
| Cy-D | Cytochalasin-D |
| d | Tag |
| DEPC | Diethyl-Pyrocarbonat |
| DIF | Doppelimmunfluoreszenz |
| DMSO | Dimehtyl-Sulfoxid |
| DNA | desoxyribonucleid acid = Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) |
| DTT | Dithiothretiol |
| E | Einheiten |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| FGF | fibroblast-growth-factor |

| | |
|-------------------|--|
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FKS | fetales Kälberserum |
| flt-1 | fms-like tyrosine kinase (= VEGF-Rezeptor-1) |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| Hepes | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) |
| HIF | hypoxia-inducible-factor |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| HUVEC | human umbilical vein endothelial cells |
| ICAM | intracellular adhesion molecule |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| Inv | Invasin |
| IPTG | Isopropyl β -D –Thiogalactopyranosid |
| kDa | Kilo-Dalton |
| KDR | kinase insert domain containing receptor (= VEGF-Rezeptor-2) |
| KKK | Katzenkratzkrankheit |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| μ Ci | Mikro-Curie |
| mCi | Milli-Curie |
| M | molar |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute |
| μ g | Mikrogramm |
| mg | Milligramm |
| μ l | Mikroliter |
| ml | Milliliter |
| MOI | means of infection = mittlere Infektionsdosis |
| mRNA | messenger ribonucleid acid |
| NaCl | Natriumchlorid |
| ng | Nanogramm |

| | |
|--------|--|
| nm | Nanometer |
| NO | Stickoxid |
| OD | optische Dichte |
| OMP | outer membrane protein |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion |
| PDGF | platelet-derived-growth-factor |
| pg | Pikogramm |
| PIGF | placenta-growth-factor |
| PMA | Phorbol-12-Myristate-13-Acetate |
| PNPP | <i>p</i> -Nitrophenyl-Phosphat-Dinatrium |
| rh | rekombinant human |
| RNA | ribonucleid acid = Ribonukleinsäure |
| rpm | rounds per minute |
| RPMI | Rosswell Park Memorial Institute Medium (Kulturmedium) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | reverse transcription polymerase chain reaction |
| s | Sekunde |
| SI | Stimulationsindex |
| spp. | Spezies |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| TRITC | Tetramethylrhodaminisothiocyanat |
| U | Units |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| VEGF | vascular-endothelial-growth-factor |
| VEGFR | vascular-endothelial-growth-factor-receptor |
| VPF | vaskulärer Permeabilitätsfaktor |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

| | | |
|-------------|---|----------|
| Nukleoside: | A | Adenosin |
| | T | Thymin |
| | G | Guanosin |
| | C | Cytosin |

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Volkhard Kempf für seine ausgezeichnete Betreuung, die zahlreichen Ideen und Denkanstöße, seine Geduld und Unterstützung und die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Herrn Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, sowie für die vielen Anregungen und wertvollen Diskussionen.

Herrn PD Dr. Schaller (Dermatologische Klinik der Universität München) danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. St. Linder und bei Herrn Prof. Dr. T. Löscher bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Mitberichterstattung.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe und der Forschungsabteilung für die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung bedanken. Insbesondere Sonja Preger und Souk Trogisch gebührt Dank für die Übernahme von Zellkulturen und die Mithilfe an Experimenten. Guntram Grassl, Niclas Hitziger, Carolin Wiedig und Uwe Kramer möchte ich für ihre Geduld und Hilfe und ihre zahlreichen Anregungen danken.

Schließlich möchte ich mich noch bei Kari Alitalo vom Haartman-Institut in Helsinki, Finnland für seine Unterstützung und Beratung bedanken.

9. Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

1. Kempf, V. A. J., Schaller, M., Behrendt, S., Volkmann, B., Aepfelbacher, M., Cakman, I., and Autenrieth, I. B. 2000. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cellular Microbiology* **2**: 1-12.
2. Kempf, V. A. J., Volkmann, B., Schaller, M., Sander, C. A., Alitalo, K., Riess, T., and Autenrieth, I. B. 2001. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cellular Microbiology* **3**(9):623-632.

Kongressbeiträge, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

1. Kempf, V. A. J., Schaller, M., Behrendt, S., Volkmann, B., Aepfelbacher, M., Cakman, I., and Autenrieth, I. B. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. ELSO-meeting, September 2000, Geneva, Switzerland.
2. Volkmann, B., Autenrieth, I. B., Schaller, M., Kempf, V. A. J. *Bartonella henselae* induced vascular endothelial growth factor (VEGF) production leads to proliferation of endothelial cells in vitro. Research Festival 2000, München.
3. Kempf, V. A. J., Volkmann, B., Schaller, M., Sander, C. A., Alitalo, K., Rieß, T., and Autenrieth, I. B. *Bartonella henselae* induces endothelial cell proliferation via VEGF: a novel two-step pathogenicity strategy. DGHM-Jahrestagung, 2001, Aachen.

-
4. Kempf, V. A. J., Volkmann, B., Schaller, M., Sander, C. A., Alitalo, K., Rieß, T., and Autenrieth, I. B. Evidence for a leading role of VEGF in *Bartonella henselae* induced endothelial cell proliferations. Euresco Conference "Biology of Type IV Secretion Processes", 2001, Castelvecchio Pascoli, Italy.

 5. Kempf, V. A. J., Volkmann, B., Rieß, T., Schaller, M., Sander, C. A., Alitalo, K., and Autenrieth, I. B. Evidence for a leading role of VEGF in *Bartonella henselae* induced endothelial cell proliferations. American Society of Rickettsiology, 2001, Big Sky, Montana.

10. Lebenslauf

Name: Bettina Volkmann
Geburtsdaten: 20. Mai 1976 in Fürstenfeldbruck

Schulbildung

1982 – 1986 Grundschule Baldham
1986 – 1995 Gymnasium Vaterstetten
06/1995 Abitur

Studium

10/1995 – 10/1996 Studium der Humanmedizin an der Universität Wien, Österreich
11/1996 – 11/2002 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
03/1998 Physikum
03/1999 1. Staatsexamen
03/2001 2. Staatsexamen
10/2002 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

10/2001 – 02/2002 Hämatologie/Onkologie, Städtisches Krankenhaus
München Harlaching
02/2002 – 06/2002 Chirurgie, Städtisches Krankenhaus München Harlaching
06/2002 – 10/2002 Anästhesiologie, Klinikum Großhadern, München

Promotionsarbeit

02/1999 – 07/2001 Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie, Lehrstuhl Bakteriologie,
LMU München, Prof. Dr. I. B. Autenrieth

Ärztin im Praktikum

seit 01/2003 Klinikum der Universität München
Klinik für Anästhesiologie