

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

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I.B. Autenrieth**

**Untersuchungen zur Inhibition der Apoptose von  
Mono Mac 6-Zellen durch *Bartonella henselae***

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

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

**vorgelegt von  
Annette Schairer  
aus  
Stuttgart**

**2004**

Dekan:

Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

2. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Wesselborg

Meinen Eltern



**Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung .....	1
1.1. Die Gattung <i>Bartonella</i> .....	1
1.2. <i>Bartonella henselae</i> .....	1
1.2.1. Erregertransmission durch Katzen .....	2
1.2.2. Klinisches Spektrum humaner <i>B. henselae</i> -Infektionen .....	2
1.2.2.1. Katzenkratzkrankheit („ <i>cat scratch disease</i> “) .....	3
1.2.2.2. Bazilläre Angiomatose und Peliosis hepatis.....	3
1.2.3. Pathogenität von <i>B. henselae</i> .....	5
1.2. Apoptose.....	8
1.2.1. Morphologische Veränderungen .....	8
1.2.2. Caspasen .....	8
1.2.3. Wege der Apoptoseinduktion .....	9
1.2.4. Apoptose und Bakterien .....	10
1.3. Ziele der vorliegenden Arbeit.....	11
2. Material und Methoden .....	13
2.1. Material.....	13
2.1.1. Geräte .....	13
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.3. Chemikalien.....	14
2.1.4. Antibiotika .....	14
2.1.5. Radioaktivität und zur radioaktiven Markierung verwendete Materialien... 15	
2.1.6. Rekombinante Zytokine .....	15
2.1.7. Antikörper.....	15
2.1.8. Enzyme .....	15
2.1.9. Medien.....	16
2.1.10. Zelllinien.....	17
2.1.11. Bakterienstämme .....	17
2.1.12. Zellbiologisch wirksame Substanzen .....	17
2.1.13. Puffer und Lösungen .....	18
2.1.14. DNA-Sonden und Primer .....	20

---

2.1.15. Kommerzielle Kits.....	20
2.2. Methoden.....	21
2.2.1. Bakterien.....	21
2.2.1.1. Bakterienanzucht für <i>in vitro</i> Infektionen .....	21
2.2.1.2. Herstellung von hitzegetöteten Bakterien für <i>in vitro</i> Untersuchungen	21
2.2.1.3. Herstellung Gentamicin-abgetöteter Bakterien für <i>in vitro</i> Untersuchungen.....	21
2.2.1.4. Anzucht von <i>B. henselae</i> – Transposon-Mutanten.....	22
2.2.2. Zellkultur .....	22
2.2.2.1. Wachstumsbedingungen und Zellkulturtechniken .....	22
2.2.2.2. Einfrieren von Zellen.....	23
2.2.2.3. Infektionsexperimente .....	23
2.2.2.4. Induktion von Apoptose .....	24
2.2.2.5. Interaktionsuntersuchungen im Zwei-Kammern-Modell.....	24
2.2.2.6. Gewinnung von Zellkulturüberständen .....	25
2.2.3. Färbungen.....	25
2.2.3.1. TUNEL-Färbung ( <i>TDT-mediated dUTP nick end labeling</i> ) .....	25
2.2.3.2. Immunfluoreszenzfärbung von <i>B. henselae</i> .....	26
2.2.4. Viabilitäts-Assay (MTS-Assay) .....	26
2.2.5. Bestimmung der VEGF-Konzentration in Zellkulturüberständen: ELISA..	27
2.2.6. Elektronenmikroskopie.....	28
2.2.7. Präparation chromosomaler DNA .....	28
2.2.7.1. Probenvorbereitung, Lyse und DNA-Präparation .....	28
2.2.8. Präparation von Kernextrakten aus Monozyten .....	29
2.2.9. <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA) .....	30
2.2.9.1. Prinzip.....	30
2.2.9.2. Markierung von Oligonukleotid-Sonden durch Phosphorylierung .....	31
2.2.9.3. Bindungsreaktion.....	32
2.2.9.4. Auftrennung der EMSA-Komplexe .....	33
2.2.10. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	33
2.2.11. Nachweis von Caspasen-Aktivierung.....	33
2.2.11.1. Herstellung von Proteinproben mittels Detergenzlyse .....	33

2.2.11.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen .....	34
2.2.11.3. Immunoblot (Western-Blot) .....	35
2.2.12. Statistik .....	35
3. Ergebnisse.....	36
3.1. <i>B. henselae</i> inhibiert Apoptose in Mono Mac 6-Zellen.....	36
3.1.1. Nachweis der Apoptoseinhibition mittels TUNEL-Assay .....	36
3.1.2. Nachweis der Apoptoseinhibition mittels MTS-Assay .....	36
3.2. Titration der PDTC-Konzentration.....	38
3.3. Abhängigkeit der Apoptoseinhibition von der Infektionsdosis mit <i>B. henselae</i> .	39
3.4. Apoptoseinhibition durch <i>B. henselae</i> Houston-1 und <i>B. quintana</i> Toulouse ...	39
3.5. Inhibition der Etoposid- und Mitomycin C-induzierten Apoptose durch <i>B. henselae</i> .....	41
3.6. Kolokalisation von <i>B. henselae</i> -Infektion und Apoptoseinhibition .....	43
3.6.1. Analyse der Kolokalisation von Apoptoseinhibition und <i>B. henselae</i> durch Immunfluoreszenz.....	43
3.6.2. Analyse der Kolokalisation der apoptoseinhibierenden Eigenschaften von <i>B. henselae</i> durch Einsatz eines Zwei-Kammern-Modells .....	45
3.6.3. <i>B. henselae</i> ist in Mono Mac 6-Zellen intrazellulär in Vakuolen lokalisiert	46
3.7. Die Rolle von VEGF in der <i>B. henselae</i> -vermittelten Apoptoseinhibition .....	47
3.7.1. Eine <i>B. henselae</i> -Infektion induziert VEGF-Produktion in Mono Mac 6- Zellen.....	47
3.7.2. VEGF ist nicht verantwortlich für die Apoptoseinhibition durch <i>B. henselae</i> .....	48
3.8. Apoptoseinhibition durch <i>B. henselae</i> in J774.A1-Makrophagen.....	49
3.9. Apoptoseinhibition durch <i>B. henselae</i> in HeLa 229-Zellen .....	50
3.9.1. Nachweis der Apoptoseinhibition mittels TUNEL-Assay .....	50
3.9.2. Nachweis der Apoptoseinhibition mittels MTS-Assay .....	51
3.10. Einfluss einer <i>B. henselae</i> -Infektion auf die Aktivierung des Transkriptions- faktors NF- $\kappa$ B .....	51
3.11. Einfluss einer <i>B. henselae</i> -Infektion auf die Aktivität von Caspase 3 .....	53
3.12. Untersuchungen der bakteriellen Faktoren, die die Apoptoseinhibition beeinflussen.....	55

---

3.12.1. Der Effekt von hitzegetöteten <i>B. henselae</i> auf die Apoptoseinhibition .....	55
3.12.2. Der Effekt von Gentamicin-behandelten <i>B. henselae</i> .....	56
3.12.3. Genetische Untersuchungen zu den apoptoseinhibierenden Faktoren von <i>B. henselae</i> .....	57
3.12.3.1. Screening einer Transposon-Mutanten-Bank von <i>B. henselae</i> auf verminderte Apoptoseinhibition.....	57
3.12.3.2. Analyse der Tn903-Insertionsstelle der Transposon-Mutanten 42, 188, 226, 227 und 232 .....	58
4. Diskussion .....	61
4.1. Die Rolle von Makrophagen.....	62
4.1.1. Makrophagen und Angiogenese .....	62
4.1.2. Makrophagen und bakterielle Infektionen.....	62
4.2. Inhibition der Apoptose: Eine Pathogenitätsstrategie von <i>B. henselae</i> ? .....	63
4.3. Mechanismen der Apoptoseinhibition durch <i>B. henselae</i> .....	65
4.3.1. Charakterisierung der apoptoseinhibierenden Faktoren von <i>B. henselae</i> ....	65
4.3.2. Zelluläre Mechanismen der Apoptoseinhibition durch <i>B. henselae</i> .....	68
4.4. Ausblick.....	74
5. Anhang .....	75
6. Zusammenfassung .....	76
7. Abkürzungen .....	78
8. Literatur .....	81
9. Publikationen und Kongressbeiträge.....	99
10. Danksagung	
11. Lebenslauf	



## **1. Einleitung**

### **1.1. Die Gattung *Bartonella***

Die Gattung *Bartonella* umfasst zur Zeit sechzehn verschiedene Spezies, darunter werden fünf als sicher humanpathogen angesehen: *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae* and *B. washoensis* (81; 100; 114).

*Bartonella henselae* wurde 1990 aus dem Blut eines HIV-Infizierten isoliert und als Ursache von Fieber und Bakteriämien identifiziert (167). Der Erreger konnte ebenfalls mit der Entstehung der Bazillären Angiomatose (141; 193), der Peliosis hepatis und mit weiteren Krankheitsbildern (siehe Tab. 1) in Verbindung gebracht werden (138; 140; 170; 171). Im Jahr 1992 wurde *B. henselae* charakterisiert und zu Ehren der medizinisch-technischen Assistentin Diane Hensel benannt (139). Zunächst *Rochalimaea henselae* genannt, wurde der Erreger 1993 als *Bartonella henselae* reklassifiziert, nachdem man eine große genetische und molekularbiologische Übereinstimmung (16S RNA und DNA – Analysen) zwischen den Bakterien der Gattung *Rochalimaea* und *Bartonella bacilliformis* festgestellt hatte (23; 128).

Die Gattung *Bartonella* gehört, wie auch *Brucella* spp., *Agrobacterium* spp. und *Rhizobium* spp., zur den  $\alpha$ -Proteobakterien (117). Agrobakterien sind Pflanzenpathogene und Auslöser der Wurzelhalsgalle (169; 197), während Rhizobien mit Pflanzen in Symbiose leben und kausal an der Entstehung der Wurzelknötchen beteiligt sind (163). Beide verursachen - wie *B. henselae* - Erkrankungen ihrer Wirtsorganismen, die durch Zellproliferationen gekennzeichnet sind.

### **1.2. *Bartonella henselae***

*B. henselae* ist ein Bakterium, das erst seit 1990 bekannt ist, jedoch zunehmend an Bedeutung gewinnt und deswegen als „new emerging pathogen“ bezeichnet wird (8; 96; 141). Die Anzucht des gramnegativen Stäbchens ist auf Schokoladen-, Kochblut- oder Hämin-angereicherten Agar-Nährböden möglich, jedoch nicht in Flüssigkultur (200). Die besten Wachstumsbedingungen liegen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% Luftfeuchtigkeit vor, durch Zugabe von FKS und Hämin wird das Wachstum verbessert. *B. henselae* wächst langsam unter mikroaerophilen Bedingungen. Auf Blutagarplatten wachsen die Kolonien bei Erstisolaten nach 12 - 14 Tagen, durch weiteres Passagieren verkürzt sich

die Zeit auf 3 - 5 Tage. Die Morphologie der Kolonien ist rau („Pili“-positiv), nach mehreren Passagen wird sie glatt („Pili“-negativ) (16). Fakultativ lebt der Erreger auch intrazellulär, z.B. in Endothelzellen (38; 43; 89).

### 1.2.1. Erregertransmission durch Katzen

*B. henselae* wird von der Katze auf den Menschen übertragen, somit kann die Erkrankung durch *B. henselae* als Zoonose angesehen werden. Vor allem junge Katzen können über Monate hinweg eine asymptomatische Bakteriämie aufweisen (2). Die Infektion des Menschen findet direkt durch Kratzer, Bisse oder Lecken der Katzen statt. Die indirekte Infektion erfolgt über den Katzenfloh *Ctenocephalides felis* (94; 179; 183). Die Übertragung von *B. henselae* von Katze zu Katze via Katzenfloh wurde 1996 experimentell gezeigt (30), zudem ist bekannt, dass der Erreger intrazellulär in Katzenerythrozyten vorliegt (99; 148; 162). Diese Tatsache erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Übertragung durch blutsaugende Arthropoden auf den Menschen möglich ist. In der Zecke *Ixodes ricinus* konnte *B. henselae* ebenfalls nachgewiesen werden, eventuell ist also auch eine Übertragung auf diesem Wege möglich (155). Für *B. quintana* (147) und *B. bacilliformis* (18) wurde die Invasion in humane Erythrozyten beschrieben, für *B. henselae* steht der Beweis dafür noch aus.

### 1.2.2. Klinisches Spektrum humaner *B. henselae*-Infektionen

**Tab. 1:** Übersicht über die durch *B. henselae* ausgelösten Erkrankungen

Immunstatus	Erkrankung	Zitat
Immunkompetent	Katzenkratzkrankheit (KKK oder CSD), atypischer Verlauf in 10%	(28)
	Rezidivierende Bakteriämie mit Fieber	(52)
	Endokarditis	(68)
Immunsupprimiert	Bazilläre Angiomatose (BA)	(19)
	Peliosis hepatis (PH)	(98)
	Rezidivierende Bakteriämie mit Fieber	(192)
	Endokarditis	(135)
	Selten: ZNS-Befall, Osteomyelitis, Manifestation an anderen inneren Organen (z.B. Lunge)	(1; 26; 29; 76)

### **1.2.2.1. Katzenkratzkrankheit („*cat scratch disease*“)**

Die Katzenkratzkrankheit wurde erstmals 1950 von Debré und Lamy beschrieben (42). Seitdem galten lange Zeit folgende klinische Kriterien, von denen drei für eine Diagnose erfüllt sein mussten: 1. Hautverletzung durch eine Katze, 2. Lymphadenopathie mit charakteristischem histopathologischen Befund, 3. positiver Hauttest nach Hangar und Rose und 4. Ausschluss aller bis dahin bekannten Erreger (11).

1983 konnte gezeigt werden, dass die Krankheit bakteriellen Ursprungs ist (190). Nach der Entdeckung von *B. henselae* wurde schnell klar, dass der Erreger mit dem Antigen des Hangar-Rose-Testes identisch war (49; 67; 133; 187).

Vor allem Kinder und Jugendliche erkranken an der Katzenkratzkrankheit (79). Sie ist typischerweise eine gutartige, selbstlimitierende Erkrankung, die ohne Antibiotikatherapie sechs bis zwölf Wochen dauert. Nach einer Katzenkratz- oder Bissverletzung entsteht innerhalb von drei bis fünf Tagen eine kleine Papel oder Pustel an der Eintrittsstelle, die nach ein bis zwei Wochen narbenlos abheilt. Ihr folgt nach sieben bis fünfzig Tagen eine Lymphadenopathie im jeweiligen Lymphabflussgebiet. Die Lymphknoten sind vergrößert und weich, aber selten schmerzhaft. Sie bilden sich normalerweise über eine Periode von Monaten bis Jahren zurück, allerdings kommt es in 10% der Fälle zu einer Abszedierung. Prädilektionsstellen sind obere Extremität, Kopf, Hals und Axillarbereich. Die Hälfte der Patienten bekommt zusätzlich leichtes Fieber, Kopfschmerzen oder Unwohlsein. Desweiteren können sich noch Übelkeit, Gewichtsverlust, Halsschmerzen und Splenomegalie entwickeln (8; 28).

In 10% der Fälle kommt es zu atypischen Manifestationen, die allerdings sehr vielfältig sind. Am häufigsten kommt es zum Parinaud'schen okkuglandulären Syndrom (Konjunktivitis mit präaurikulärer Lymphadenopathie), gefolgt von Enzephalitis, zerebraler Arteriitis, Radikulitis, Myelitis, granulomatöser Hepatitis oder Splenitis, atypischer Pneumonie, hilärer Adenopathie, Pleuraerguß, Osteomyelitis, Erythema nodosum, Erythema annulare und Parotisschwellung (66; 86; 115; 164).

### **1.2.2.2. Bazilläre Angiomatose und Peliosis hepatis**

Die Bazilläre Angiomatose (BA) wurde erstmals bei AIDS-Kranken beschrieben (35; 175) und tritt typischerweise bei immunsupprimierten Personen auf (140), in seltenen Fällen kommt sie aber auch bei immunkompetenten Patienten vor (34).

Bei der kutanen BA handelt es sich makroskopisch um livide, stecknadelkopfgroße Papeln, die sich zu Knötchen oder Tumoren entwickeln. Die Läsionen können einzeln oder multipel auftreten. Mikroskopisch sind lobuläre kapilläre Gefäßproliferationen epitheloider, teilweise atypischer Endothelzellen charakteristisch, die Blutgefäße auskleiden und möglicherweise in das Lumen hineinragen. Oft finden sich entzündliche Infiltrate, die Bartonellen, neutrophile Granulozyten und leukozytoklastischen Debris enthalten (3). Außerdem werden die Läsionen typischerweise von aktivierten Monozyten und Makrophagen infiltriert (104; 122).

Die parenchymale BA betrifft innere Organe, z.B. die Mukosa von Gastrointestinaltrakt, Milz, Leber, Lunge, Endokard oder Knochenmark (113). Die Patienten leiden unter Hautläsionen, abdominellen Symptomen, Fieber und Lymphadenopathie.

Die bazilläre Peliosis hepatis (PH) kann als eine Sonderform der BA angesehen werden. Durch zystische Vasoproliferation entstehen in der Leber blutgefüllte Kavernen, aus denen sich der Erreger anzüchten lässt (98).

In der systemischen Therapie der bazillären Angiomatose gelten Clarithromycin und Azithromycin als Antibiotika der Wahl. Alternativ kommen auch Erythromycin, Doxycyclin oder Ciprofloxacin in Betracht (152), bei schweren Infektionen sollte eine Kombination von Doxycyclin und Rifampicin in Erwägung gezogen werden (152). Die Therapiedauer ist abhängig vom Immunstatus des Patienten. Bei immunkompetenten Patienten sind meist zwei bis vier Wochen ausreichend, während bei Immunsupprimierten mindestens über zwei Monate therapiert werden sollte (19).



**Abb. 1:** Kutane Form der Bazillären Angiomatose bei einem HIV-Patienten

([http://edcenter.med.cornell.edu/Pathophysiology\\_Cases/HIV/Cutaneous\\_Manifestations/4976.gif](http://edcenter.med.cornell.edu/Pathophysiology_Cases/HIV/Cutaneous_Manifestations/4976.gif))

### 1.2.3. Pathogenität von *B. henselae*

Über die Interaktion zwischen *B. henselae* und Wirtszelle und über die zugrunde liegenden Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae* ist nur wenig bekannt. Es hat sich jedoch in vielen Fallstudien gezeigt, dass die schwersten Manifestationen bei Personen mit geschwächter zellulärer Immunität wie z.B. HIV-Infizierten auftreten (27; 83; 95; 165). Jedoch kann es auch bei Immunkompetenten zu persistierenden Bakteriämien kommen (108). Daraus kann man schließen, dass *Bartonella* durch intrazelluläre Persistenz die Abwehrmechanismen des Wirtes umgeht. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass zur Therapie von *B. henselae*-Infektionen vor allem Antibiotika geeignet sind, die sich durch einen hohen Wirkspiegel in eukaryoten Zellen auszeichnen. Außerdem konnte beim Kultivieren von *B. henselae* aus peripherem Blut durch Einführung eines Lyseschlusses (Auflösung der Zellmembran) eine größere Keimzahl erreicht werden (24).

Für einen fakultativ intrazellulär lebenden Erreger wie *B. henselae* (9) sind effiziente Adhäsions- und Invasionsmechanismen von großer Bedeutung. Bei *B. henselae* wurden bislang mindestens neun Oberflächenmembranproteine (*outer membrane proteins*, OMP) in der Größe von 28 - 171 kDa identifiziert. Davon näher untersucht sind sogenannte „Pili“ („Typ IV-like Pili“), die wichtig für die Adhäsion an Wirtszellen sind und eine Rolle in der Autoagglutination spielen. „Pilus“-negative Stämme adhären an und invadieren in Zellen sehr viel weniger als „Pilus“-positive (16), außerdem ist ihre Fähigkeit, die Produktion von vaskulo-endotheliale Wachstumfaktor (*vasculo-endothelial growth factor*, VEGF) zu induzieren, nur gering ausgeprägt (87). Zudem haben „Pilus“-negative *B. henselae* die Fähigkeit verloren, an extrazelluläre Matrixkomponenten wie z.B. Fibronectin oder Kollagen zu binden (143).

Neue Untersuchungen zeigen, dass diese „Typ IV-like Pili“ durch ein ca. 340 kDa großes, nicht-fimbrielles Adhäsionsmolekül repräsentiert wird. Wegen struktureller und funktioneller Ähnlichkeit zu dem Adhäsionsprotein *Yersinia* Adhäsion A (YadA) von *Yersinia enterocolitica* wurde es analog *Bartonella* Adhäsion A (BadA) benannt. Das Protein besteht aus einem Kopf, einer Neck-Region, einem Stiel und einem Membrananker. Es zeigte sich, dass BadA eine wesentliche Rolle in der Endothelzell-Adhäsion und in der Induktion proangiogenetischer Zytokine spielt (143).

Weiterhin besitzt *B. henselae* ein Typ IV-Sekretionssystem homolog zu dem von *Agrobacterium tumefaciens* und anderen  $\alpha 2$ -Proteobakterien. Genetische Analysen weisen darauf hin, dass das Sekretionssystem aus einem Multiprotein-Kanal besteht, der DNA oder Proteine vom Bakterium in die Wirtszelle transportieren kann. Entsprechende Gen-Cluster von *B. henselae* zeigen eine signifikante Homologie zu denen von *A. tumefaciens*. Dieses Bakterium nutzt das Typ IV-Sekretionssystem, um T-DNA in die Zelle einzuschleusen. Die T-DNA inseriert in das Pflanzengenom und codiert für pflanzliche Wachstumshormone, die zu dem typischen Tumorwachstum der Wurzelhalsknolle in Pflanzen führen (31; 208). Die Funktion des Typ IV-Sekretionssystems bei *B. henselae* ist noch unklar, allerdings wird angenommen, dass es für das intrazelluläre Überleben von *B. henselae* wichtig ist (161).

*B. henselae* als fakultativ intrazellulärer Erreger ist in der Lage, in Endothelzellen, Makrophagen und andere eukaryote Zellen zu invadieren (124). Dabei können die Bakterien über Endozytose oder über die Aufnahme eines Bakterienclusters, Invasom genannt, in die Zelle gelangen (43). In Endothelzellen vermehren sich Bartonellen besser und schneller als auf unbelebten Nährmedien (25; 89). Endothelzellen, die mit *B. henselae* infiziert sind, proliferieren ihrerseits schneller als uninfizierte Zellen (38), sie bleiben in der Zellkultur länger viabel und liegen länger in einem intakten Monolayer (96).

Es wird angenommen, dass über die ausgelöste Endothelzellproliferation das Wachstum von *B. henselae* gefördert wird. Das könnte einerseits durch Proteine der Wirtszelle geschehen, da die gesteigerte intrazelluläre Vermehrung von *B. henselae* nur bei intakter Proteinsynthese der Zelle abläuft (89). Andererseits bieten mehr Zellen *B. henselae* einen größeren Lebensraum. Es ist kann also spekuliert werden, dass die tumorösen Krankheitsbilder BA und PH, in deren Läsionen *B. henselae* nachzuweisen ist (137), durch diese Überlebensstrategie bedingt sind: *B. henselae* induziert nach dieser Hypothese das eigene Habitat durch VEGF-getriggertes Endothelzellwachstum (88). Dafür spricht auch, dass die Gefäßtumoren nach Behandlung der Patienten mit Antibiotika wieder verschwinden (8; 191).

Innerhalb der Wirtszelle werden durch die Infektion mit *B. henselae* multiple Veränderungen bewirkt. *In-vitro*-Untersuchungen haben ergeben, dass *B. henselae* in THP-1-Makrophagen, in HeLa- (Zervixkarzinom-Zellen) und in Ea.hy 926-Zellen

(Fusion aus HUVEC und Lungenkarzinomzellen) eine Produktion von VEGF induziert (142). VEGF ist ein Mitogen, das eine grundlegende Rolle in der Angiogenese spielt (202) und in der Lage ist, das Wachstum von Endothelzellen zu stimulieren. Außerdem ist bekannt, dass VEGF antiapoptotische Aktivität besitzt (48; 63; 123). Kürzlich wurde gezeigt, dass durch eine Infektion mit *B. henselae* HIF-1 in Wirtszellen aktiviert und damit ein HIF-1-reguliertes Genmuster induziert wird (90).

Weiterhin induziert eine *B. henselae*-Infektion eine Hochregulation von Intrazellulärem Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), was zu einem verstärkten Durchtritt von Entzündungszellen ins Gewebe führt (111). Zudem kommt es zu einer verstärkten Ausschüttung von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und IL-8 (124; 142).

*B. henselae* induziert in Endothelzellen eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Nukleärer Faktor kappa-B) (61). Zur NF- $\kappa$ B-Familie gehören verschiedene Proteine: Rel, RelA (p65) und RelB besitzen Transkriptionsdomänen, während NF- $\kappa$ B1 (p50) und NF- $\kappa$ B2 (p52) eher als Repressoren und Modulatoren der anderen Mitglieder der Familie dienen. In den meisten Zellen liegen die Rel-Proteine in inaktiver Form vor, welche durch Assoziation mit inhibitorischen Proteinen (I $\kappa$ B) zustande kommt (72). In Zellen, die durch Zytokine, Mitogene oder Stress stimuliert worden sind, werden diese I $\kappa$ Bs phosphoryliert, ubiquitiniert und abgebaut (195). Außerdem wird p50 durch Abspalten aus dem Vorläuferprotein p105 bzw. p52 durch Abspalten aus p100 aktiviert (112).

Zudem wurde gezeigt, dass *B. henselae* Endothelzellen über die Hemmung von Caspasen und der DNA-Fragmentation vor Apoptose schützt (92). Dieser Mechanismus wird nach neuesten Ergebnissen über das virB Typ IV-Sekretionssystem von *B. henselae* vermittelt (156). Diese antiapoptotische Aktivität kann auf verschiedene Arten interpretiert werden. Erstens ist der Erreger intrazellulär vor der Immunantwort des Organismus geschützt (69), es wäre also ungünstig, wenn *B. henselae* durch die Apoptose der Wirtszelle freigesetzt werden würde und somit der Immunabwehr des Wirtes ausgeliefert wäre. Zweitens könnte es eine Möglichkeit sein, die Zerstörung des eigenen Habitats zu verhindern.

## 1.2. Apoptose

Zelltod ist ein wichtiger Teil der Entwicklung und des Lebens von mehrzelligen Organismen. Grundsätzlich kann man zwei Formen unterscheiden. Nekrose ist eine passive Form des Zelltodes, die relativ langsam vor sich geht, der die charakteristischen Merkmale des aktiven Zelltodes fehlen und die mit einer Entzündungsreaktion einhergeht. Dem gegenüber steht die Apoptose als ein genau regulierter Prozess, der überflüssige, alte, beschädigte oder infizierte Zellen beseitigt, ohne dass es zu einer Entzündung kommt (102; 181). Apoptose ist essentiell für einen ungestörten Ablauf der Embryonalentwicklung, aber auch für die Gewebshomöostase adulter Organismen. Störungen der Regulation können zu vielen Krankheiten führen, beispielsweise zu Autoimmunkrankheiten, Neoplasien und degenerativen ZNS-Erkrankungen (134; 203).

### 1.2.1. Morphologische Veränderungen

Zelltod durch Apoptose ist charakterisiert durch typische biochemische und morphologische Veränderungen in der Zelle. Wichtig sind zytoplasmatisches Schrumpfen, das Ausstülpfen von Membranabschnürungen (sog. „*blebbing*“), Kondensation und Fragmentation von nukleärem Chromatin, außerdem DNA-Fragmentation zu Stücken von 180 bp (10; 37). Ein weiteres Kennzeichen ist die Bildung von Apoptosekörperchen („*apoptotic bodies*“), kleiner membranumhüllter Vesikel, die phagozytiert werden (91; 201). Die Phagozytose wird über die Exposition von Phosphatidylserin an der Oberfläche der Membran induziert (57).

### 1.2.2. Caspasen

Ein wichtiger Schritt zur Einleitung der Apoptose ist die Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Caspasen sind Enzyme, die evolutionär vom Insekt bis zum Menschen hoch konserviert sind (50). Sie sind Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, die ein Cystein in ihrem aktiven Zentrum haben und Proteine nach einem C-terminalen Aspartatrest, dem bestimmte Erkennungssequenzen vorausgehen müssen, schneiden (182). Sie liegen in der Zelle als inaktive Proform vor und werden durch Proteolyse und eventuell durch zusätzliche Dimerisierung aktiviert (168). Autokatalytische Aktivierung spielt vor allem bei den Effektor-Caspasen eine Rolle. Von dieser Verstärkung des Signals durch autokatalytische Aktivierung kommt die Bezeichnung Caspasen-Kaskade. Am Anfang



der Kaskade stehen die Initiator-Caspasen 8, 9 und 10, die zur Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 führen (36; 78).

Die Effektor-Caspasen bedingen multiple Veränderungen in der Zelle. Es kommt zu gestörten Reparaturprozessen, Anhalten des Zellzyklus, Inaktivierung von Apoptoseinhibitoren und zum Strukturzusammenbruch der Zelle (136).

Caspase 3 als eine der wichtigsten Effektor-Caspasen spaltet die inhibitorische Unter-einheit ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNase*), die normalerweise in der Zelle die Aktivität der DNase CAD (Caspase-aktivierte Deoxyribonuklease) unterdrückt. Nach Freisetzung aus dem Heterodimer mit ICAD schneidet CAD DNA zwischen den Nucleosomen, was zu den typischen Fragmenten der DNA-Leiter, Multiplen von 180 bp, führt (55; 154). Aber auch die Spaltung von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase), Phospholipase A2 und Caspase 6 gehört zu den Funktionen von Caspase 3 (196).

Die Spaltung des nukleären Lamins durch Caspasen führt zum Schrumpfen und zur Knospung („*budding*“) des Kerns (188). Der Verlust der Zellstruktur kommt durch Spaltung von Proteinen des Zytoskeletts wie beispielsweise Aktin zustande (82). Schließlich führt das Spalten der Kinase PAK2 zu den apoptotischen Membranausstülpungen (151).

### **1.2.3. Wege der Apoptoseinduktion**

Apoptose kann über verschiedene Wege induziert werden. Beim sogenannten Todesrezeptorweg binden Liganden (Fas-Ligand, TNF etc.) an Rezeptoren wie z.B. CD95 (Apo-1/Fas) oder TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis inducing ligand R1*), die daraufhin Aggregate bilden (13). Über Adaptorproteine wird Procaspase 8 rekrutiert und aktiviert, somit wird die Caspasen-Kaskade in Gang gesetzt (78; 172). Ein anderer Weg führt über die Mitochondrien. Dabei bilden Bcl-2-Proteine Membrankanäle, durch die Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt wird, oder es kommt zur Ruptur der äußeren mitochondrialen Membran (70). Außerdem werden weitere Proteine wie AIF (*Apoptosis-inducing factor*) (119; 176) und Smac/DIABLO (*Second mitochondria derived activator of caspase / Direct IAP-binding protein with low pI*) freigesetzt. Smac/DIABLO inhibiert IAP (*Inhibitor of apoptosis*) und fördert so die

Aktivierung der Caspasen (53; 184). Zwischen dem Todesrezeptorweg und dem mitochondrialen Weg bestehen Verbindungen im Sinne einer positiven Rückkopplung. Cytochrom c wird zur Aktivierung von Caspase 9 benötigt (105). Diese bildet erst zusammen mit Apaf-1 und Cytochrom c eine aktive Form (145). Dieser Komplex wird Apoptosom genannt; er kann weiter unten in der Kaskade Effektorcaspasen aktivieren. Desweiteren sind andere zelluläre Proteasen am Prozess der Apoptose beteiligt. Ein Beispiel sind die Enzyme des Ubiquitin-Proteasom-Weges. Dieser Weg ist das wichtigste nicht-lysosomale proteolytische System der Zelle (107; 198), über ihn wird IκB abgebaut und so NF-κB aktiviert. NF-κB induziert wiederum die Transkription von multiplen Genen, inklusive solcher, die das Überleben der Zelle fördern, wie z.B. IAPs, Bcl-2 und Bfl-1/A1 (207).

#### **1.2.4. Apoptose und Bakterien**

Schon seit langem ist die Tatsache bekannt, dass Bakterien in der Lage sind, Apoptose von eukaryotischen Zellen auszulösen. *Yersinia enterocolitica* bspw. induziert in Makrophagen Apoptose über YopP/J (*Yersinia* outer protein P/J). Diese Proteine werden mittels Typ III-Sekretionssystem in das Zytoplasma sekretiert und induzieren dort Apoptose über die Inhibition von NF-κB (150). Möglicherweise geschieht das, um die Zytokinantwort, die normalerweise zur Entzündung führt, zu unterdrücken (5).

Salmonellen und Shigellen induzieren Apoptose über Ipa- (*invasion protein antigen*) und Sip- (*Salmonella invasion protein*) Proteine, die ebenfalls via Typ III-Sekretionssystem in das Zytoplasma von Makrophagen transportiert werden und dort Caspase 1 aktivieren. Die Bakterien nutzen die daraus resultierende Entzündung, um weiter ins Gewebe vorzudringen (121; 209).

Erreger benutzen also die Apoptose von Makrophagen und anderen Wirtszellen, um einen Überlebensvorteil zu haben. Allerdings kann es auch für den Wirtsorganismus vorteilhaft sein, wenn infizierte Zellen „Selbstmord“ begehen. Dadurch kann verhindert werden, dass Bakterien sich intrazellulär der Immunantwort entziehen, dort überleben und eventuell in andere Gewebe verteilt werden. Die freigesetzten Bakterien werden potenten Abwehrzellen wie Neutrophilen bzw. dem humoralen Arm der Immunantwort ausgesetzt (125), außerdem verlieren intrazellulär lebende Organismen ihr Habitat.

Für viele intrazellulär lebende Bakterien ist es daher eine ökologisch sinnvolle Überlebensstrategie, die Apoptose ihrer Wirtszellen zu verhindern. Mykobakterien (54; 101) und Brucellen (71) sind in der Lage, spontan auftretende Apoptose in Monozyten zu inhibieren. *Rickettsia rickettsii* verhindert die Apoptose von Endothelzellen über eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B (33). Chlamydien als obligat intrazelluläre Zellparasiten sind ebenfalls in der Lage, Endothelzellen sowie Makrophagen an der Apoptose zu hindern, allerdings über eine Inhibition der Cytochrom c-Freisetzung (6; 59). Kürzlich wurde gezeigt, dass *B. henselae* ebenfalls in der Lage ist, die Apoptose von Endothelzellen zu inhibieren (92; 156).

### **1.3. Ziele der vorliegenden Arbeit**

Da Bartonellen in der Lage sind, in Endothelzellen zu überleben und in diesen Apoptose zu verhindern, sollte in der vorliegenden Dissertation untersucht werden, ob *B. henselae* fähig ist, die Apoptose von Monozyten und HeLa-Zellen ebenfalls zu inhibieren. Von diesen Zelllinien ist bekannt, dass sie nach einer Infektion durch *B. henselae* VEGF sekretieren können und demzufolge ein valides Modell zur Untersuchung der Genese der vaskuloproliferativen Erkrankungen BA und PH darstellen.

Zu diesem Zweck wurden Zellen mit apoptoseinduzierenden Substanzen behandelt und zusätzlich mit *B. henselae* infiziert. Der Anteil apoptotischer Zellen sollte mittels TUNEL-Assay nachgewiesen und die Viabilität der Zellen im MTS-Assay gemessen werden. Eine weitere Aufgabe war, die Rolle der beteiligten bakteriellen Faktoren durch den Vergleich von viablen mit hitzegetöteten sowie Gentamicin-behandelten Bartonellen zu analysieren. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Infektion einer Zelle die Voraussetzung für den Schutz vor Apoptose ist. Dazu sollte die Kollokalisierung von Inhibition der Apoptose und Infektion durch *B. henselae* mittels Immunfluoreszenzfärbung, Elektronenmikroskopie und Infektion in einem Zwei-Kammern-Modell untersucht werden.

Die Induktion einer VEGF-Produktion wurde durch Messung des VEGF im Überstand der *B. henselae*-infizierten Zellen erforscht. Die Rolle des VEGF in der Apoptoseinhibition wurde mittels Zugabe von VEGF-neutralisierenden Antikörpern analysiert. Zudem sollten die beteiligten zellulären Faktoren erforscht werden, die an dem Prozess

der Apoptosehemmung beteiligt sind. Dazu sollte NF- $\kappa$ B mittels EMSA sowie Caspase 3 mittels Westernblot untersucht werden.

Schließlich sollte analysiert werden, welche bakteriellen Gene an der antiapoptotischen Eigenschaft von *B. henselae* maßgeblich beteiligt sind. Dazu sollte eine Transposonmutantenbank auf *B. henselae*-Mutanten durchsucht werden, die keine antiapoptotische Aktivität mehr aufweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten einen Beitrag zum Verständnis der Rolle der Wirtszellapoptose bei der Infektion mit *B. henselae* leisten und den Pathomechanismus der Induktion von BA und PH auf einem zellulären Level weiter aufklären.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Geräte**

Analysenwaage: Modell 1801	Sartorius, Göttingen
Brutschränke: BB6220	Heraeus, Hanau
Entwicklermaschine: Curix 60	AGFA, Köln
Eppendorfpipetten und Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Gelelektrophorese: PowerPac 1000, Protean II-Gelapparatur	BioRad, München BioRad
Gelschüttler: Unimax 2010	Heidolph, Kelheim
Geltrockner: Modell 583	BioRad
Gradientenmischer: Modell 355	BioRad
Immunoblotting-Apparatur: Trans-Blot-Kammer	BioRad
Mikroskope:	
Axiovert 25, Axiolab	Zeiss, Jena
DMRE	Leica, Heidelberg
Konfokales Laser Scanning Mikroskop Typ DM IRE 2	Leica
Neubauer Zählkammer	Superior, Lauda-Königshofen
pH-Meter: Modell inoLab <sup>®</sup> Level 2	WTW, Weilheim i. OB
Photometer für 96-well-Platten: Modell Sunrise	Tecan, Crailsheim
Photometer: Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pipettierhelfer: Pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt
Sicherheitswerkbank: BDK-S 1800	BDK Luft- und Reinraum- technik, Sonnenbühl
Szintillationszähler: Topcount NXT <sup>™</sup>	Packard, Dreieich
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortexer: Modell MR 3001 K	Heidolph

Wasserbad	Memert, Schwabach
Zentrifugen:	
Multifuge 3 S-R, Biofuge Stratos	Heraeus
Zytozentrifuge: Labofuge 400	Heraeus
Eppendorf 5412 R, Minispin plus	Eppendorf

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Nunc, Roskilde, Dänemark; Sartorius; Becton-Dickinson, Heidelberg; B. Braun, Melsungen; Eppendorf; Greiner, Nürtingen; Sarsted, Nümbrecht, Kimberly-Clark, Mülheim-Kärlich; Millipore, Schwalbach.

### 2.1.3. Chemikalien

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien von der Firma E. Merck, Darmstadt, Feinchemikalien von der Firma Sigma, Deisenhofen und Zellkulturmedien sowie Zusätze für die Zellkultur von der Firma Biochrom, Berlin, bezogen.

BSA (Albumin bovine Fraction V)	Biomol, Hamburg
BioRad Protein Assay Farbstoff Konzentrat	BioRad
CellTiter 96 <sup>®</sup> AQueous MTS Reagent Powder	Promega, Madison, USA
Click/RPMI, Natriumpyruvat, Collagen G	Biochrom
nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom
Dulbecco's PBS mit CaCl <sub>2</sub> / MgCl <sub>2</sub>	Biochrom
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia
FKS, OPI Media Supplement, Phenazin-Methosulfat	Sigma
PBS, L-Glutamin, Trypsin-EDTA	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe

### 2.1.4. Antibiotika

Penicillin, Streptomycin	Gibco Invitrogen Corp.
Kanamycin, Gentamicin	Sigma

### 2.1.5. Radioaktivität und zur radioaktiven Markierung verwendete Materialien

$\gamma$ -P <sup>32</sup> -ATP	Amersham Pharmacia
Polynukleotid-Kinase-Puffer, T4-PNK	New England Biolabs, Frankfurt
Aufreinigungssäulen:	
NucTrap® Probe Purification Column	Stratagene, Amsterdam, NL
Push Column Beta Shield Device	Stratagene

### 2.1.6. Rekombinante Zytokine

rekombinantes humanes VEGF (293-VE)	R&D Systems, Wiesbaden
rekombinantes humanes TNF- $\alpha$ (T-6674)	Sigma

### 2.1.7. Antikörper

Ziege anti-VEGF human (AF-293-NA)	R&D Systems
Kaninchen anti- <i>B. henselae</i>	(89)
Maus anti-Caspase 3	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S.Wesselborg, Tübingen (58)

#### Sekundärantikörper:

Ziege anti-Kaninchen IgG, TRITC-konjugiert (T-6778)	Sigma
Ziege anti-Maus IgG(H+L), Peroxidase-konjugiert (111-035-003)	Dianova, Hamburg
Kaninchen anti-NF- $\kappa$ B p50 (sc-1190X)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kaninchen anti-NF- $\kappa$ B p65 (sc-372X)	Santa Cruz
Kaninchen anti-c-Rel (sc-6955X)	Santa Cruz

### 2.1.8. Enzyme

Proteinase K, RNase A	Qiagen, Hilden
-----------------------	----------------

### 2.1.9. Medien

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

**Tab. 2:** Übersicht über die in der Zellkultur eingesetzten Medien

Zellkulturmedium für Mono Mac 6-Zellen (supplementiertes RPMI)	500 ml RPMI 1640 5 x 10 <sup>5</sup> E Penicillin, 50 mg Streptomycin 1% nicht essentielle Aminosäuren (100x) OPI Media Supplement 2 mM L-Glutamin 10% FKS
Zellkulturmedium für J774.A1-Zellen (supplementiertes RPMI)	500 ml RPMI 1640 5 x 10 <sup>5</sup> E Penicillin und 50 mg Streptomycin 0,5% 2-Mercaptoethanol 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1% nicht essentielle Aminosäuren (100x) 10% FKS
Zellkulturmedium für HeLa 229-Zellen (supplementiertes RPMI)	500 ml RPMI 1640 5 x 10 <sup>5</sup> E Penicillin und 50 mg Streptomycin 2 mM L-Glutamin 10% FKS
Einfriermedium für Zellen	10% DMSO 50% FKS in RPMI 1640

**Tab. 3:** Übersicht über die in der Bakterienkultur eingesetzten Medien

Columbia-Agarplatten mit 5% Schafsblut	Becton-Dickinson
Blutagarplatten	39 g Columbia-Agar (Oxoid, Hampshire, GB) H <sub>2</sub> O ad 1 l 5% defibriniertes Schafblut (Acila, Walldorf)
Einfriermedium für Bakterien	20% Glycerol in LB-Medium
LB (Luria-Bertani)-Medium	5 g NaCl 5 g Bacto Hefeextrakt 10 g Bacto Trypton H <sub>2</sub> O ad 1 l, pH 7,4-7,6 mit NaOH



### 2.1.10. Zelllinien

**Tab. 4:** Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien

Zelllinie	Zelltypus	Organ	Herkunft / Quelle
Mono Mac 6	Monozytenzelllinie	Blut: Monozytenleukämie	(205)
J774.A1	Murine Makrophagenzelllinie	Aszites: Retikulumzell-Sarkom	ATCC, Rockville, MD, USA (TIB-67) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K. Ruckdeschel, München
HeLa 229	Epithelzellen	Zervix: Adeno-Karzinom	ATCC (CCL-2.1) (64)

### 2.1.11. Bakterienstämme

**Tab. 5:** Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme

Bakterien	Herkunft / Quelle	Referenz
<i>B. henselae</i> Marseille	Patientenisolat, frühe Passage	(51)
<i>B. henselae</i> Houston-1	ATCC 49882	(139)
<i>B. quintana</i> Toulouse	collection de l'Institut Pasteur, CIP 103739, Paris, France; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Sander, Freiburg	(139)
<i>B. henselae</i> Marseille Transposon-Mutanten-Bank Nr. 1-260	V. Kempf, Tübingen	(144)

### 2.1.12. Zellbiologisch wirksame Substanzen

Etoposid, Staurosporin	Sigma
Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC)	Sigma
Mitomycin C	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Wesselborg, Tübingen

### 2.1.13. Puffer und Lösungen

**Tab. 6:** Übersicht über Lösungen für den MTS-Assay

MTS-Lösung	2 mg Cell Titer 96 <sup>®</sup> AQueous MTS Reagent Powder pro ml Dulbecco's PBS mit CaCl <sub>2</sub> / MgCl <sub>2</sub> , pH 6,5
PMS-Lösung	0,92 mg Phenazin-Methosulfat pro ml Dulbecco's PBS mit CaCl <sub>2</sub> / MgCl <sub>2</sub>

**Tab. 7:** Übersicht über Puffer und Lösungen zur Herstellung von Kernextrakten

Puffer A	10 mM Hepes (pH 7,6) 15 mM KCl 2 mM MgCl <sub>2</sub>
Puffer C	25 mM Hepes (pH 7,6) 50 mM KCl 0,1 mM EDTA (pH 8,0) 10% Glycerol 1% Complete Proteinase Inhibitor-Lösung
Complete Proteinase Inhibitor	1 Tablette in 5 ml PBS Roche Diagnostics, Mannheim
Igepal CA-630 (Octylphenoxy)-polyethoxyethanol	Sigma

**Tab. 8:** Lösungen und DNA-Sonden für den EMSA-Bindungsansatz

<i>dIdC</i>	Amersham Pharmacia
DTT	Gibco Invitrogen Corporation

**Tab. 9:** Allgemeine Puffer und Lösungen

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 M EDTA
Karnowski-Reagenz	4% Glutaraldehyd in 0,05 M Phosphat-gepufferter Lösung mit 0,15 M NaCl (pH 7.3)

**Tab. 10:** Übersicht über die für die PAGE eingesetzten Puffer und Lösungen

10x TBE-Puffer	108 g Tris-Base 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 H <sub>2</sub> O ad 1 l
10x Elektrophoresepuffer	151 g Tris 720 g Glycin 50 g SDS H <sub>2</sub> O ad 5 l
5x SDS-Probenpuffer	314 mM Tris-HCl (pH 6,8) 50% (v/v) Glycerin 5% (w/v) SDS 0,0025% Bromphenolblau 5% 2-Mercaptoethanol
Gellösung für 5%ige nicht denaturierende Polyacrylamid-gele	3 ml 10x TBE 10 ml 30% Acrylamid-Stammlösung (Roth, Karlsruhe) 500 µl APS (Ammoniumpersulfat), 10% (w/v) 50 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethylendiamin) 47 ml H <sub>2</sub> O
Gellösung für 6%ige SDS-Polyacrylamid-Trenngele	7,5 ml Tris-Puffer (1,5 M, pH 8,8) 6 ml 30% Acrylamid-Stammlösung 300 µl SDS 10% (w/v) 126 µl APS 10% (w/v) 12 µl TEMED H <sub>2</sub> O ad 30 ml
Gellösung für 15%ige SDS-Polyacrylamid-Trenngele	7,5 ml Tris-Puffer (1,5 M, pH 8,8) 15 ml 30% Acrylamid-Stammlösung 300 µl SDS 10% (w/v) 100 µl APS 10% (w/v) 10 µl TEMED H <sub>2</sub> O ad 30 ml
Gellösung für Sammelgele	1,25 ml Tris-Puffer (1,0 M, pH 6,8) 1,7 ml 30% Acrylamid-Stammlösung 300 µl SDS 10% (w/v) 100 µl APS 10% (w/v) 10 µl TEMED H <sub>2</sub> O ad 10 ml

**Tab. 11:** Puffer und Lösungen für Immunoblot

IP Lysepuffer	50 mM Tris (pH 7,6) 150 mM NaCl 10% Complete Proteinase Inhibitor-Lösung 1% Triton X-100
10x Tank-Blot-Puffer	146,5 g Glycin 264 g Tris H <sub>2</sub> O ad 5 l
10x Tank-Blot-Puffer mit Methanol	146,5 g Glycin 264 g Tris 20% Methanol H <sub>2</sub> O ad 5 l
10x Waschpuffer TBS/Triton X-100 (pH 7,5)	125,98 g Tris (pH 7,5) 701,28 g NaCl 71,5 ml HCl 0,2% Triton X-100 H <sub>2</sub> O ad 8 l
Blockierungspuffer	5% Magermilch in TBS/Triton X-100

**2.1.14. DNA-Sonden und Primer****Tab. 12:** DNA-Sonden für EMSA und Primer zur Sequenzierung

DNA-Sonde / Primer	Sequenz	Quelle / Herkunft
NF-κB Konsensus (NF-κB c)	5'-AGTTGAGGGGACT TTCCCAGGC-3'	Santa Cruz
NF-κB Mutiert (NF-κB m)	5'-AGTTGAGGCGACT TTCCCAGGC-3'	Santa Cruz
<KAN-2> FP-1 (3'-Ende des Transposons)	5'-ACCTACAACAAAG CTCTCATCAACC-3'	Epicentre Technologies, Madison, WI, USA, Anleitung des Herstellers
<KAN-2> RP-1 (5'-Ende des Transposons)	5'-GCAATGTAACATC AGAGATTTTGAG-3'	Epicentre Technologies, Anleitung des Herstellers

**2.1.15. Kommerzielle Kits**

VEGF-ELISA-Kit	R&D Systems (DVE00)
In Situ Cell Death Detection Kit / FITC	Roche Diagnostics (1684795)
Genomic-tip 100/G, Genomic DNA Buffer Set	Qiagen

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Bakterien

#### 2.2.1.1. Bakterienanzucht für *in vitro* Infektionen

Für die Experimente wurde, soweit nicht anderweitig vermerkt, *B. henselae* Marseille (51) benutzt. Die Bakterien wurden auf Columbia-Agar-Platten mit 5% Schafsblut ausgestrichen und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit bebrütet. Für Infektionsexperimente wurde *B. henselae* nach 5 Tagen von den Platten mit Watte-stäbchen abgenommen und in PBS resuspendiert. Die Bakterien wurden mit PBS gewaschen, in Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle der Bakterienanzahl wurden serielle Verdünnungsreihen der Bakterien-suspension auf Blutagar ausplattiert und nach 14 Tagen ausgezählt.

Zu Infektionsversuchen wurden die Bakterien aufgetaut, mit dem entsprechenden Zellkulturmedium gewaschen und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die tatsächlich verwendete Keimzahl wurde durch serielles Ausplattieren kontrolliert.

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

Zur Herstellung hitzegetöteter Bakterien wurden Reaktionsgefäße mit *B. henselae* aufgetaut und die Bakterien in sterilem PBS gewaschen. Danach wurden die Bakterien für 40 min bei 60°C im Tischinkubator inaktiviert. Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert (3800 g, RT, 10 min), in frischem Medium aufgenommen, auf die gewünschte Konzentration eingestellt und für Infektionsexperimente verwendet. Zur Kontrolle wurde die Bakteriensuspension auf Blut-Agar-Platten ausgestrichen und über 4 Wochen bebrütet um sicher zu stellen, dass alle Bakterien abgetötet waren.

#### 2.2.1.3. Herstellung Gentamicin-abgetöteter Bakterien für *in vitro* Untersuchungen

Zur Herstellung Gentamicin-inaktivierter Bakterien wurden Reaktionsgefäße mit *B. henselae* aufgetaut und die Bakterien in sterilem PBS gewaschen. Danach wurden die Bakterien für 2 Stunden in Gentamicin-haltigem Medium (100 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf die gewünschte Konzentration eingestellt und für Infektionsexperimente verwendet. Zur Kontrolle wurde die Bakteriensuspension auf

Blut-Agar-Platten ausgestrichen und über 4 Wochen bebrütet um sicher zu stellen, dass alle Bakterien abgetötet waren.

#### **2.2.1.4. Anzucht von *B. henselae* – Transposon-Mutanten**

Die *B. henselae* – Transposon-Mutanten (144) wurden auf Blut-Agar-Platten mit 30 µg/ml Kanamycin ausgestrichen und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit bebrütet. Nach 5 Tagen wurden sie mit Wattestäbchen geerntet und in PBS resuspendiert. Die optische Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 550$  nm im Photometer bestimmt und eine OD<sub>550</sub> von 1 (entspricht einer Bakterienanzahl von ca.  $5 \times 10^8$ /ml, (84)) eingestellt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, in entsprechendem Medium resuspendiert und für Infektionsexperimente verwendet. Die Bakterienanzahl wurde durch serielles Ausplattieren kontrolliert.

### **2.2.2. Zellkultur**

#### **2.2.2.1. Wachstumsbedingungen und Zellkulturtechniken**

Für die Zellkulturversuche wurden eine humane Monozyten- (Mono Mac 6-Zellen), eine humane Epithelzelllinie (HeLa 229) sowie eine murine Monozytenzelllinie (J774.A1) verwendet. Soweit nicht gesondert erwähnt, wurden die Kultivierung und *in vitro*-Zellkulturexperimente in entsprechendem Zellkulturmedium (siehe Tab.2) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

Tiefgefrorene Zellen wurden aufgetaut und in 200 ml-Zellkulturflaschen ausgesät.

Für die Kultur der nicht adhärenen Mono Mac 6-Zellen wurden die Zellen in einer Dichte von  $0,3 \times 10^6$ /ml ausgesät. Nach zwei bis vier Tagen wurden die Zellen in 15 ml-Reaktionsgefäße überführt (eventuell leicht adhärenente Zellen lösten sich durch Spülen mit Medium), abzentrifugiert (400 g, RT, 5 min), in PBS gewaschen und nach Bestimmen der Zellzahl neu ausgesät.

Bei adhärenen Zellen (J774, HeLa) entstand nach dem Adhärenen der Zellen am Flaschenboden aus Polystyren (Nunc) innerhalb ca. einer Woche ein konfluenter Monolayer. Um die Zellen auf neue Flaschen aufzuteilen, wurden die Zellen zur Komplexierung der für die Adhäsion der Zellen an Oberflächen notwendigen Ca<sup>2+</sup>-Ionen kurz mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung überspült. Durch Inkubation in 3 ml

Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei Raumtemperatur werden Adhäsionsproteine der Zelloberfläche gespalten, wonach sich die Zellen leicht vom Flaschenboden lösen. Nach Zugabe von 10 ml Medium wurde die Zellsuspension je nach Bedarf im Verhältnis 1:3 bis 1:5 auf neue Flaschen aufgeteilt.

#### **2.2.2.2. Einfrieren von Zellen**

Die Zellen wurden aus den Kulturflaschen geerntet, abzentrifugiert und in einer Konzentration von  $1-2 \times 10^7$  Zellen pro ml Einfriermedium (s. Tab. 2) aufgenommen und aliquotiert. Um ein langsames und schonendes Abkühlen der Zellen auf  $-80^\circ\text{C}$  zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst für mehrere Stunden bei  $-20^\circ\text{C}$  und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **2.2.2.3. Infektionsexperimente**

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

Für Infektionsexperimente wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die gewünschte Zellzahl mit dem entsprechenden Medium eingestellt. Die Zellen wurden anschließend in Zellkulturplatten ausgesät. In 6-well-Platten wurden  $2 \times 10^6$  Zellen ausgesät, in 24-well-Platten  $2,5 \times 10^5$  (Mono Mac 6-Zellen) bzw.  $1 \times 10^5$  (adhärente Zellen) und in 96-well-Platten  $5 \times 10^4$  (Mono Mac 6-Zellen) bzw.  $2 \times 10^4$  (adhärente Zellen). Nicht adhärente Zellen wurden am Tag der Infektion, adhärente Zellen am Tag vor der Infektion ausgesät.

Am Tag der Infektion wurden Reaktionsgefäße mit *B. henselae* aufgetaut. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (3800 g, RT, 10 min), einmal in entsprechendem Medium gewaschen und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die Infektion erfolgte mit verschiedenen MOI (10, 50, 100, 200, 1000, 2000). Die Apoptose der Wirtszellen wurde durch verschiedene Substanzen induziert (s. Tab. 13). Die Apoptoseinduktoren wurden sowohl zu uninfizierten Zellen als Positivkontrolle als auch zu infizierten Zellen zugegeben. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die in reinem Medium kultiviert

wurden. Nach der Infektion wurden die Bakterien zur Verbesserung des Bakterien-Zell-Kontaktes auf die Wirtszellen zentrifugiert (400 g, RT, 5 min).

#### 2.2.2.4. Induktion von Apoptose

Die Apoptose der Wirtszellen wurde durch verschiedene Substanzen ausgelöst, die nachfolgend aufgelistet sind. Die angegebenen Konzentrationen sind die Endkonzentrationen, die auf die Zellen einwirkten.

**Tab. 13:** In dieser Arbeit verwendete Apoptoseinduktoren

Apoptoseinduktor	Lösungsmittel	Eingesetzte Konzentration	Referenz
PDTC	H <sub>2</sub> O	10, 20, 50, 100, 200, 500 µM	(44; 204)
Etoposid	DMSO	25 µg/ml	(194)
Mitomycin C	Methanol	25 µg/ml	(194)
Staurosporin	DMSO	1 µM	(59)

#### 2.2.2.5. Interaktionsuntersuchungen im Zwei-Kammern-Modell

In einem Zwei-Kammern-Modell zur räumlichen Trennung von Zellen und Bakterien sollte untersucht werden, welche Wechselwirkungen ohne direkten Kontakt zwischen Mono Mac 6-Zellen und *B. henselae* auftreten. Dafür wurden in 24-well-Platten Mono Mac 6-Zellen ausgesät, zu den entsprechenden Versuchsgruppen wurde PDTC zugegeben. Anschließend wurden Filter (Millicell-CM low height Culture Plate Insert 30 mm, Porengröße 0,4 µm, Millipore) in die entsprechenden Vertiefungen der 24-well-Platten eingesetzt und *B. henselae* in PDTC-haltigem Medium dazu gegeben. Zur Kontrolle dienten Zellen, die unmittelbar mit *B. henselae* infiziert wurden (s. 2.2.2.3.) bzw. Zellen, die nur mit PDTC behandelt wurden.

Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Filter herausgenommen, die Zellen wurden durch vorsichtiges Spülen gelöst und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (400 g, RT, 5 min) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 500 µl Medium resuspendiert. Davon wurden jeweils 100 µl in eine 96-well-Platte pipettiert. Die weitere Auswertung erfolgte mittels MTS-Assay (s. 2.2.4.).



### 2.2.2.6. Gewinnung von Zellkulturüberständen

Die VEGF-Produktion von Mono Mac 6-Zellen wurde nach bakterieller Stimulation aus Zellkulturüberständen mittels ELISA untersucht. Die Zellkulturüberstände wurden 24 und 72 h nach Infektion abgenommen, wobei der Zeitpunkt Null definiert war als Zeitpunkt der Zugabe des Stimulus zu den Zellen. Nach Zentrifugation (21000 g, 4°C, 10 min) zur Entfernung störender Partikel wurde der Überstand bis zu weiteren Untersuchungen bei -20°C gelagert.

### 2.2.3. Färbungen

#### 2.2.3.1. TUNEL-Färbung (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*)

Während der Apoptose kommt es in Zellen zur DNA-Spaltung. Dadurch entstehen doppelsträngige, niedermolekulare DNA-Fragmente und Einzelstrangbrüche (*nicks*). Diese DNA-Strangbrüche können durch eine enzymatische Reaktion angefärbt werden, indem freie 3'-OH-Enden mit modifizierten Nukleotiden markiert werden. Im „In Situ Cell Death Detection Kit“ (Roche Diagnostics) wird dazu das Enzym Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) benutzt, welches Nukleotide matrizenunabhängig an freie 3'-OH-Enden anheftet. Die Nukleotide sind mit Fluoreszein markiert, so dass die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgen kann.

Für diese TUNEL-Färbung wurden Zellen in eine 24-well-Platte ausgesät, wie unter 2.2.2.3. beschrieben infiziert und mit Apoptoseinduktoren behandelt. Nach entsprechender Infektionsdauer wurden nicht adhärente Zellen per Zytospinzentrifuge (30 g, RT, 5 min) auf Objektträger aufgebracht ( $1-2,5 \times 10^5$  Zellen). Nach jedem folgenden Arbeitsschritt wurden die Objektträger in PBS gewaschen und luftgetrocknet. Adhärente Zellen wurden auf runde Deckgläschen ausgesät, die Färbung erfolgte ebenso wie die der Objektträger, allerdings ohne Lufttrocknung zwischen den Arbeitsschritten.

Zunächst wurden die Zellen in 4%igem Paraformaldehyd (pH 7,4 in PBS) für 1 h fixiert. Als nächstes folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis in 0,1% Triton X-100 in 0,1% Natriumcitrat, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 37°C im Brutschrank in der Reaktionslösung (*Enzyme Solution* und *Label Solution* im Verhältnis 1:10) inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mittels

Fluoprep (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) für die IF-Mikroskopie behandelt. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop mittels Auszählung von 300 Mono Mac 6-Zellen pro Versuchsgruppe.

#### **2.2.3.2. Immunfluoreszenzfärbung von *B. henselae***

Zur gleichzeitigen Darstellung von Apoptose und bakterieller Infektion wurde eine Immunfluoreszenz (IF) von *B. henselae* durchgeführt. Nach jedem Arbeitsschritt der Färbung wurden die Objektträger in PBS gewaschen, um überschüssige Reagenzien zu entfernen, und anschließend luftgetrocknet.

Für gleichzeitige IF- und TUNEL-Färbung wurden Mono Mac 6-Zellen in eine 24-well-Platte ausgesät und infiziert. Nach der gewünschten Infektionsdauer wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert, mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert und mit 0,1% Triton X-100 in 0,1% Natriumcitrat permeabilisiert (s. 2.2.3.1.). Anschließend wurden die Zellen 15 min mit 0,1%igem BSA in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Kaninchen anti-*B. henselae*, Verdünnung 1:2000 in PBS) für 1 h, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit dem mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) konjugierten Sekundärantikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG, Verdünnung 1:100 in PBS). Hierdurch wurden extrazelluläre sowie intrazelluläre Bartonellen rot gefärbt. Danach wurden die Objektträger 1 h mit der Reaktionslösung der TUNEL-Färbung inkubiert (siehe 2.2.3.1.). Die Konservierung und die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

#### **2.2.4. Viabilitäts-Assay (MTS-Assay)**

Zur Messung der Viabilität der Zellen wurde der „Cell Titer 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ (Promega) benutzt. Metabolisch aktive Zellen besitzen Dehydrogenasen. Diese sind in der Lage, MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium, *inner salt*) in Anwesenheit eines elektronenbindenden Stoffes (PMS, Phenazin-Methosulfat) in ein Formazan zu reduzieren. Die Absorption des Formazans bei 490 nm kann direkt photometrisch bestimmt werden. Damit stellt der MTS-Assay einen indirekten Nachweis der Zellviabilität dar (173).

Für den MTS-Assay wurden Zellen in eine 96-well-Platte ausgesät und wie unter 2.2.2.3. beschrieben infiziert. Als Leerwert wurde für jede Versuchsgruppe ein well angesetzt, in dem alle entsprechenden Komponenten außer den Zellen vorhanden waren. Nach entsprechender Infektionsdauer wurden PMS- und MTS-Lösung nach Herstellerangaben im Verhältnis 1:21 gemischt, die Mischung im Verhältnis 1:6 in die wells zugegeben und über zwei Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte, indem die OD des Leerwertes von der jeweiligen Versuchsgruppe abgezogen wurde. Das Ergebnis der Negativkontrolle wurde dann als 100% Viabilität definiert und die Ergebnisse der anderen Versuchsgruppen in Relation dazu gesetzt.

#### **2.2.5. Bestimmung der VEGF-Konzentration in Zellkulturüberständen: ELISA**

Zum Nachweis von VEGF in Zellkulturüberständen wurde ein VEGF-ELISA durchgeführt. 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 in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte haftet. 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 VEGF, R&D Systems) wurde die absolute Konzentration ermittelt.

Zum Nachweis von VEGF im Überstand wurde ein bereits mit murinem, monoklonalem Antikörper beschichteter ELISA (VEGF-ELISA-Kit, R&D Systems) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurden zuerst 50 µl Verdünnungspuffer, dann 200 µl VEGF-Standard bzw. Zellkulturüberstand in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der ELISA für 2 h mit 200 µl Konjugat inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal gewaschen. Zuletzt wurden

200 µl Entwicklerlösung dazugegeben. Nach einer 20minütigen Inkubationszeit wurde die Entwicklung mit 50 µl Stopplösung beendet. Die Absorption wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 540 nm im ELISA-Photometer bestimmt und daraus anhand des Standards die Zytokinkonzentration bestimmt.

### **2.2.6. Elektronenmikroskopie**

Zur Erstellung elektronenmikroskopischer Bilder wurden zunächst Mono Mac 6-Zellen im 6-well-Format wie oben beschrieben infiziert und mit Apoptoseinduktoren behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen abzentrifugiert (400 g, RT, 5 min), in Medium resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet vorsichtig mit 1 ml Karnowski-Reagenz zur Fixierung versetzt. Nach nochmaliger Zentrifugation wurden von Herrn Prof. Dr. Schaller, Universitäts-Hautklinik Tübingen, freundlicherweise die elektronenmikroskopischen Bilder angefertigt.

### **2.2.7. Präparation chromosomaler DNA**

#### **2.2.7.1. Probenvorbereitung, Lyse und DNA-Präparation**

Zur Präparation chromosomaler DNA wurden zunächst *B. henselae*-Transposon-Mutanten (144) auf Blut-Agar-Platten, die 30 µg/ml Kanamycin enthielten, ausgestrichen und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit über 5 Tage bebrütet. Anschließend wurden sie mit Wattestäbchen abgenommen, in PBS resuspendiert und abzentrifugiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte nach den Angaben des *Qiagen Genomic DNA Handbook*. Die Zellpellets wurden in 1 ml B1-Puffer mit 0,002 % RNase A resuspendiert. Dann wurde jeweils 80 µl Lysozym und 100 µl Proteinase K zugeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,2 ml B2-Puffer wurden die Proben für 30 min bei 50°C inkubiert.

Währenddessen wurden *Qiagen Genomic Tips* mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Nach der 30minütigen Inkubation bei 50°C wurden die Proben resuspendiert und auf die Säulen gegeben. Nach Durchlaufen der Probe wurde die Säule zweimal mit 7,5 ml QC-

Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Säulen auf 15 ml-Reaktionsgefäße gesetzt und die chromosomale DNA wurde mittels 5 ml 50°C-warmem QF-Puffer eluiert.

Zur Präzipitation der DNA wurden 3,5 ml 100 %iges Isopropanol zum Eluat zugegeben. Nach Schütteln des Reaktionsgefäßes konnte die präzipitierte DNA mit einer Plastiköse entnommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt werden. Die DNA wurde in 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und abschließend in 100 µl destilliertem Wasser gelöst.

Zur Quantifizierung und zur Reinheitskontrolle wurde die chromosomale DNA 1:20 in destilliertem Wasser verdünnt und am Photometer vermessen. Bei einer Ratio Extinktion<sub>260</sub> : Extinktion<sub>280</sub> von 1,7 bis 1,9 wurde die Reinheit und Qualität der DNA als ausreichend betrachtet.

### **2.2.8. Präparation von Kernextrakten aus Monozyten**

Die Präparation von Kernextrakten erfolgte nach dem Prinzip der Hochsalz-Extraktion (160). Mono Mac 6-Zellen wurden dafür in 6-well-Platten ausgesät und 1 h lang mit *B. henselae* infiziert und/oder mit PDTC behandelt. Für die weitere Präparation wurden nur vorgekühlte Reagenzien verwendet, es wurde auf Eis gearbeitet und alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C.

Die Zellen wurden in 15 ml-Reaktionsgefäße überführt und in PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 3 ml Puffer A (Tab. 7) resuspendiert und 5 min inkubiert. Durch die hypotone Salzkonzentration kam es zum Anschwellen der Zellen. Nach Zentrifugation (400 g, 5 min) wurde das Zellpellet in 2 ml Puffer A + 0,002% Igepal aufgenommen und für 10–15 min inkubiert, bis unter mikroskopischer Kontrolle die Zellmembran der meisten Zellen aufgelöst, die Kernmembran aber noch intakt war. Die Zellkerne wurden mittels Zentrifugation pelletiert (2000 g, 10 min). Der trübe Überstand mit den zytoplasmatischen Enzymen wurde verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl Puffer C (Tab. 7) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gewaschen und in 50 µl Puffer C mit 4,2 µl 5 M NaCl aufgenommen. Während einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proteine aus dem Zellkern extrahiert, so dass sie gelöst vorlagen. Durch anschließende Zentrifugation (21000 g, 10 min) wurde der Zelldebris von den Proteinen getrennt, die weiterhin im Überstand vorlagen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß

überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Proteinkonzentration der Kernextrakte wurde nach der Bradford-Methode bestimmt (s. 2.2.10).

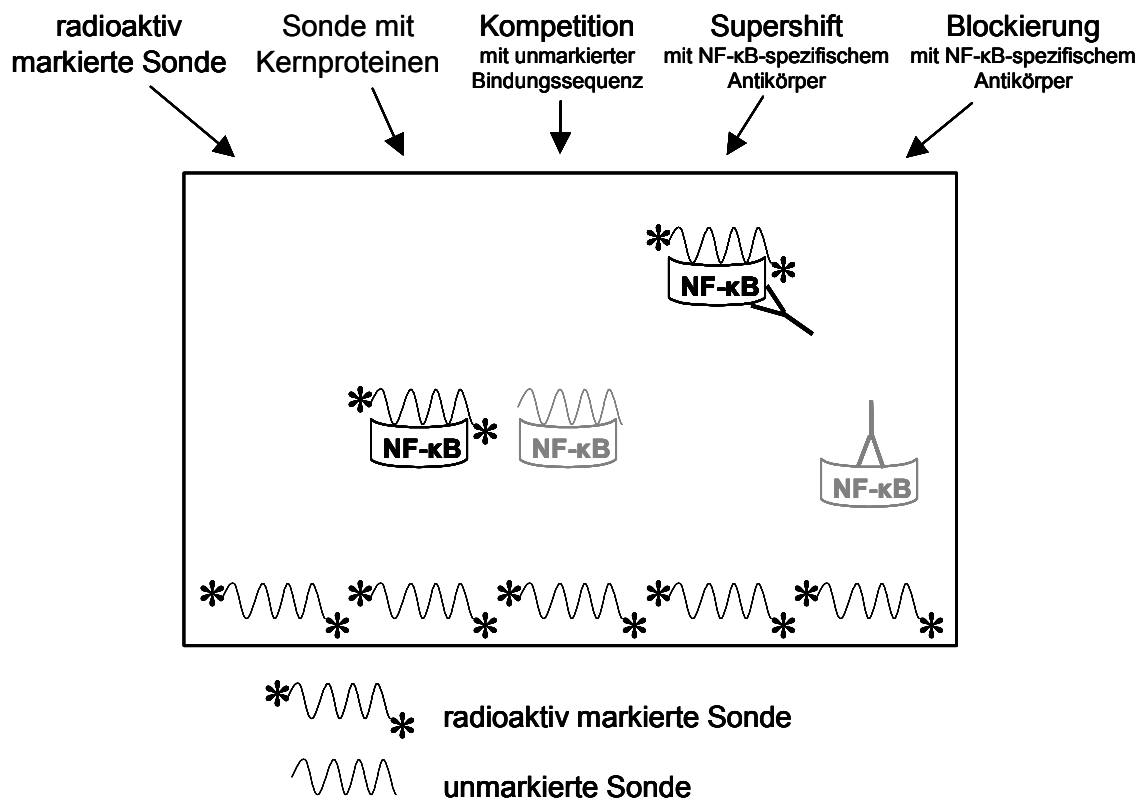
### **2.2.9. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)**

#### **2.2.9.1. Prinzip**

Der *electrophoretic mobility shift assay*, kurz EMSA, ist eine Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen DNA-Sequenzen und Kernproteinen. Die Methode gibt Auskunft darüber, welche Proteine *in vitro* mit der DNA interagieren können (Abb. 2).

Als Sonde werden synthetische Oligonukleotide mit der zu untersuchenden DNA-Sequenz verwendet. Die einzelsträngigen Oligomere werden zu Doppelsträngen hybridisiert und radioaktiv markiert. Während der Bindungsreaktion wird die Sonde gemeinsam mit Kernextrakt inkubiert. Der Ansatz wird schließlich auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Besitzt die Sonde Bindungsstellen für im Kernextrakt enthaltene Proteine, so können diese an die DNA binden. Dabei entstehen DNA-Protein-Komplexe, die aufgrund des höheren Molekulargewichts im Gel langsamer wandern als die freie Sonde.

Um die Spezifität der Komplexe zu überprüfen, werden Konkurrenzexperimente mit unmarkierter Sonde bzw. Supershifts durchgeführt. Für die Konkurrenz wird die kalte, d.h. nicht radioaktive Sonde im molaren Überschuss zum Bindungsansatz gegeben. Können die Proteine eines Komplexes den Kompetitor binden, so wird die Sonde durch die nicht markierten Oligomere verdrängt, und die entsprechende Bande wird schwächer oder verschwindet völlig. Durch einen Supershift kann mit Hilfe von Antikörpern das Protein selbst identifiziert werden. Erkennt ein Antikörper DNA-gebundene Proteine, so bindet er zusätzlich am DNA-Protein-Komplex und führt zu einer weiteren Erhöhung des Molekulargewichts (Supershift) oder er blockiert die DNA-Bindungsstelle des Proteins, so dass keine Bindung zwischen DNA und Protein zustande kommt und keine Bande sichtbar wird.



**Abb. 2:** Prinzip des *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA). Die radioaktiv markierte DNA (mit Sternchen) wird mit Kernextrakt inkubiert. NF-κB erkennt die Erkennungssequenz auf der DNA und bindet an diese. Die DNA-Protein-Komplexe wandern im Polyacrylamidgel langsamer als die freie Sonde. In Anwesenheit eines Überschusses von unmarkierter Sonde bindet NF-κB vor allem an diese und steht für eine Bindung an die markierten Sondenmoleküle nicht mehr zur Verfügung. Die Bindung eines Antikörpers in Supershift-Ansätzen führt zu einer weiteren Erhöhung des Molekulargewichtes des DNA-Protein-Komplexes. Alternativ blockiert der Antikörper die DNA-Bindungsstelle von NF-κB, so dass die markierte Sonde nicht mehr binden kann.

### 2.2.9.2. Markierung von Oligonukleotid-Sonden durch Phosphorylierung

Es wurden Oligomere mit glatten Enden (*blunt ends*) verwendet (NF-κB Konsensus, siehe Tab. 12). Sie wurden durch Übertragung radioaktiver Phosphat-Gruppen durch die Polynukleotid-Kinase des Phagen T4 (T4-PNK) markiert.

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Adenosin-Di- und Triphosphate mit einer „NucTrap<sup>®</sup> Probe Purification Column“ in Kombination mit den „Push Column Beta Shield Device“ abgetrennt. Die Sonde befand sich schließlich in ca. 100 µl STE-Puffer (TE mit 0,1 M NaCl).

Kinase-Ansatz:            2  $\mu$ l doppelsträngiges Oligomer (3 pmol/ $\mu$ l)  
                              3  $\mu$ l 10x PNK-Puffer  
                              4  $\mu$ l  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP  
                              2  $\mu$ l T4-PNK (10 U/ $\mu$ l)  
                              19  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

### 2.2.9.3. Bindungsreaktion

Während der Bindungsreaktion erfolgt die Komplexbildung zwischen der radioaktiv markierten Sonde und den Kernproteinen an spezifischen DNA-Bindungsstellen.

Bindungsansatz:            6  $\mu$ g Kernextrakt  
                              40% (v/v) Puffer C (Tab. 7)  
                              93 mM NaCl  
                              30 kcpm Sonde  
                              1  $\mu$ g dIdC  
                              10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
                              1 mM EDTA, pH 8  
                              5% (v/v) Glycerin  
                              1 mM DTT  
                              0,03% Bromphenolblau

Das Gesamtvolumen betrug 15  $\mu$ l, die NaCl-Menge wurde auf 93 mM eingestellt. Der Ansatz wurde vor Zugabe der Sonde 15 min auf Eis inkubiert.

In Kompetitions- und Supershift-Ansätzen wurden zusätzlich 20-40 ng unmarkierte Oligonukleotide mit intakten oder mutierten Konsensus-Sequenzen bzw. 1-2  $\mu$ l Antikörper-Reagenz eingesetzt. Es wurden gereinigte polyklonale (NF- $\kappa$ B p50, NF- $\kappa$ B p65) bzw. monoklonale Antikörper (c-Rel) mit einer Konzentration von 2 mg/ml verwendet. Kompetitoren und Antikörper wurden zu Beginn zum Bindungsansatz zugegeben, die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte bei Raumtemperatur. Nach Zugabe der Sonde folgte eine 15-30minütige Inkubation auf Eis.



#### **2.2.9.4. Auftrennung der EMSA-Komplexe**

Die Komplexe wurden in einem 5%igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (Tab. 10) mit 0,5x TBE als Laufpuffer für 1 h 40 min bei 220 V aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman 3mm-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert und für mindestens 40 min bei 80°C auf einem Vakuumgeltrockner getrocknet. Die Exposition von Röntgenfilmen (Kodak Scientific Imaging Film, 18 x 24 cm) und Phosphoimagerplatten erfolgte je nach Stärke der Signale entweder für 24 h oder für mehrere Tage.

#### **2.2.10. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Kernextrakten erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays (Bio-Rad, München) in Anlehnung an die Methode nach Bradford (22). Die zu testenden Proben wurden mit destilliertem Wasser auf eine geeignete Konzentration verdünnt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine BSA-Verdünnungsreihe angesetzt. In 1,5 ml-Reaktionsgefäßen wurden 800 µl Probenverdünnung zu 200 µl „Protein Assay“-Lösung geben und gemischt. Es folgte eine photometrische Messung bei 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Eichkurve rechnerisch ermittelt.

#### **2.2.11. Nachweis von Caspasen-Aktivierung**

##### **2.2.11.1. Herstellung von Proteinproben mittels Detergenzlyse**

Zur Herstellung von Proteinproben wurden Zellkulturexperimente mit Mono Mac 6-Zellen im 6-well-Format wie oben beschrieben durchgeführt. Nach ausreichender Infektionsdauer wurden die Zellen in 15 ml-Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert (400 g, RT, 5 min). Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 18000 g für 60 sec bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

Zur Detergenzlyse wurden Zellen und IP Lysepuffer (s. Tab. 11) aufgetaut. Jedes Zellpellet wurde in 60 µl IP Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Zellbestandteile (18000 g, 4°C, 10 min) wurde

der Überstand abgenommen und mit 15 µl SDS-Probenpuffer (5-fach) gemischt. Abschließend wurden die Proben für 5 min bei 95°C im Tischinkubator erhitzt, um die Proteine zu denaturieren.

#### **2.2.11.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen**

Die Auftrennung von Proteinfractionen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Bei diesem Verfahren werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Masse getrennt. SDS als anionisches, amphipathisches Detergenz im Auftragspuffer bindet durchschnittlich im Verhältnis 1:1,4 pro Aminosäure an die kationischen Reste der Proteine und verleiht ihm damit eine negative Überschussladung, die sich proportional zur Größe des Proteins verhält und die dem Protein eigene Ladung vernachlässigbar macht. Darüber hinaus nehmen alle SDS-denaturierten Proteine eine lineare Konformation ein, was den Einfluss der nativen Oberflächenstruktur auf die Wanderungseigenschaften der Proteine aufhebt. Die Proteine wandern daher im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihr Laufverhalten während der Elektrophorese ausschließlich von ihrer Größe abhängig ist. Die Trennung der Proteine im Gel erfolgt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes, wobei der Trennbereich über die Acrylamid-Konzentrationen im Gel kontrolliert werden kann. Die Acrylamidkonzentration kann zwischen 2% und 30% variieren und bestimmt die Porengröße.

Acrylamid, Tris-Puffer, A. bidest. und SDS-Lösung wurden gemischt (Tab. 10) und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS eingeleitet. Zuerst wurde für das Trenngel die 15%ige und die 6%ige Trenngelflüssigkeit mittels Gradientenmischer in eine Vertikalkammer (10,5 cm x 7,5 cm x 1,0 mm) bis zu 2/3 des Endvolumens gefüllt und mit Isopropanol (70%) überschichtet, um eine glatte Trennfläche zu erhalten. In den Trenngelen bestand demnach ein kontinuierlicher Konzentrationsgradient von 6% nach 15%. Nach halbstündlicher Polymerisation des Trenngels und Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel in das verbleibende Volumen der Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach erneuter halbstündlicher Polymerisation des Sammelgels erfolgte der Probenauftrag in die Taschen des zuvor entfernten Kammes, in die äußeren Taschen wurde ein Proteinmarker (*Full Range Rainbow protein molecular weight marker* RPN 800, Amersham Pharmacia) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde

in 1x SDS-Elektrophorese-Puffer zunächst für 15 min bei 200 V durchgeführt, anschließend wurde die Elektrophorese für 800 Vh durchgeführt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele für ein Immuno-Blotting weiterverwendet.

### **2.2.11.3. Immunoblot (Western-Blot)**

Der Transfer von Proteinen von SDS-Gelele auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran erfolgte nach der Tank-Blot-Methode. Dafür wurden Gel und Membran übereinander gelegt und von beiden Seiten mit je einer Lage Whatman-Filterpapier und je einem Schwamm bedeckt. Diese Schichtung wurde in eine Trans-Blot-Kammer eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte in Tank-Transfer-Puffer mit Methanol (siehe Tab. 11) bei einer konstanten Stromstärke von 500 mA über 90 Minuten. Die PVDF-Membran wurde anschließend zur Blockierung von freien Bindungsstellen für 1 h in Blockierungspuffer auf einem Gelschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Detektion wurde die Membran über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln mit Caspase 3-Antikörpern (1:250 in Waschpuffer verdünnt) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit Waschpuffer wurde der Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus IgG; 1:4000 in Blockierungspuffer verdünnt) zugegeben. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln. Anschließend wurde erneut dreimal gewaschen und dann mit ECL-Reagenz inkubiert. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurde die Membran zunächst in Frischhaltefolie eingeschweißt und im Dunkeln für 1-30 min auf einen Röntgenfilm gelegt, der anschließend entwickelt wurde.

### **2.2.12. Statistik**

Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Es wurde jeweils eine Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Datenbewertung erfolgte über den Student t-Test. Die Differenz von Werten mit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant beurteilt (206).

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. *B. henselae* inhibiert Apoptose in Mono Mac 6-Zellen**

##### **3.1.1. Nachweis der Apoptoseinhibition mittels TUNEL-Assay**

Um zu untersuchen, ob *B. henselae* in der Lage ist, die Apoptose von Monozyten zu inhibieren, wurden Mono Mac 6-Zellen mit *B. henselae* infiziert und/oder zur Apoptoseinduktion mit dem NF- $\kappa$ B-Inhibitor PDTC behandelt (s. 2.2.2.3.). Ein entsprechendes Modell wurde bereits früher zur Untersuchung der Apoptoseinhibition durch *Chlamydia pneumoniae* beschrieben (186).

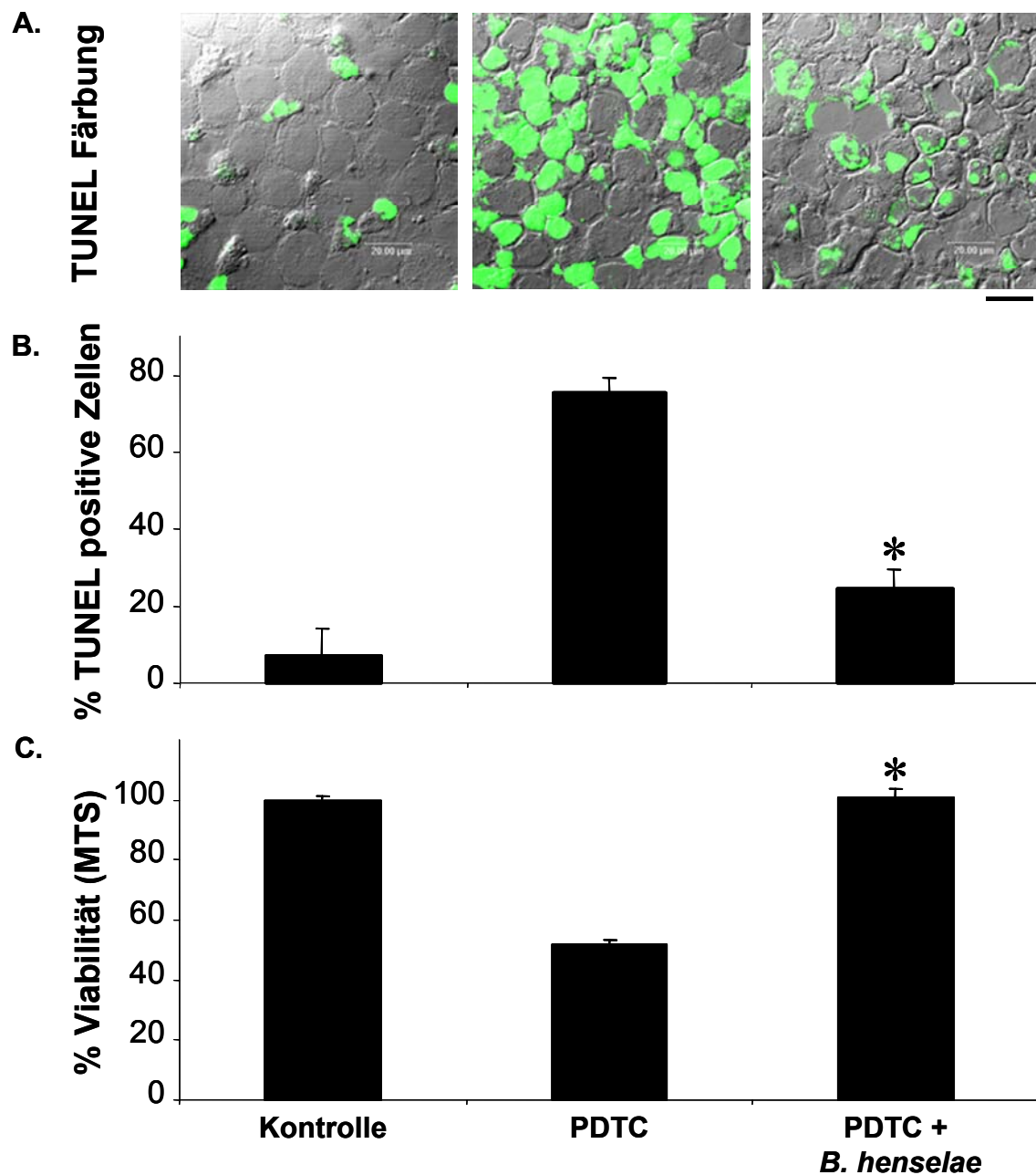
Nach 24 h Inkubationsdauer wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay (s. 2.2.3.1.) und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie ermittelt. Es zeigte sich, dass durch die Behandlung der Zellen mit PDTC 75% der Zellen apoptotisch waren, während in der unbehandelten Negativkontrolle 7% apoptotische Zellen vorlagen. Zellen, die mit PDTC behandelt und gleichzeitig mit *B. henselae* infiziert wurden, waren nur zu 24% apoptotisch (Abb. 3a,b). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass *B. henselae* in der Lage ist, die Apoptose von Mono Mac 6-Zellen zu inhibieren.

##### **3.1.2. Nachweis der Apoptoseinhibition mittels MTS-Assay**

Parallel zu dem unter 3.1. beschriebenen Ansatz wurde ein MTS-Viabilitätsassay durchgeführt, um die Zellviabilität in einem quantifizierbaren Verfahren zu analysieren. Mono Mac 6-Zellen wurden mit *B. henselae* infiziert und/oder mit PDTC behandelt. Nach der gegebenen Zeit wurde ein MTS-Assay durchgeführt (siehe 2.2.4.). Die Auswertung erfolgte mittels Absorptionsmessung im ELISA-Photometer.

Es zeigte sich, dass die Zugabe von PDTC die Viabilität der Zellen von 100% auf 52% reduzierte. Zellen, die gleichzeitig zur PDTC-Behandlung mit *B. henselae* infiziert wurden, zeigten hingegen eine Viabilität von 101% (Abb. 3c). Die durch den MTS-Assay ermittelten Ergebnisse waren mit denen des TUNEL-Assays vergleichbar. Folglich kann man in diesem System Viabilitätsanstieg mit Apoptosereduktion gleichsetzen und die Ergebnisse als Bestätigung der TUNEL-Assays betrachten.

## 3. Ergebnisse

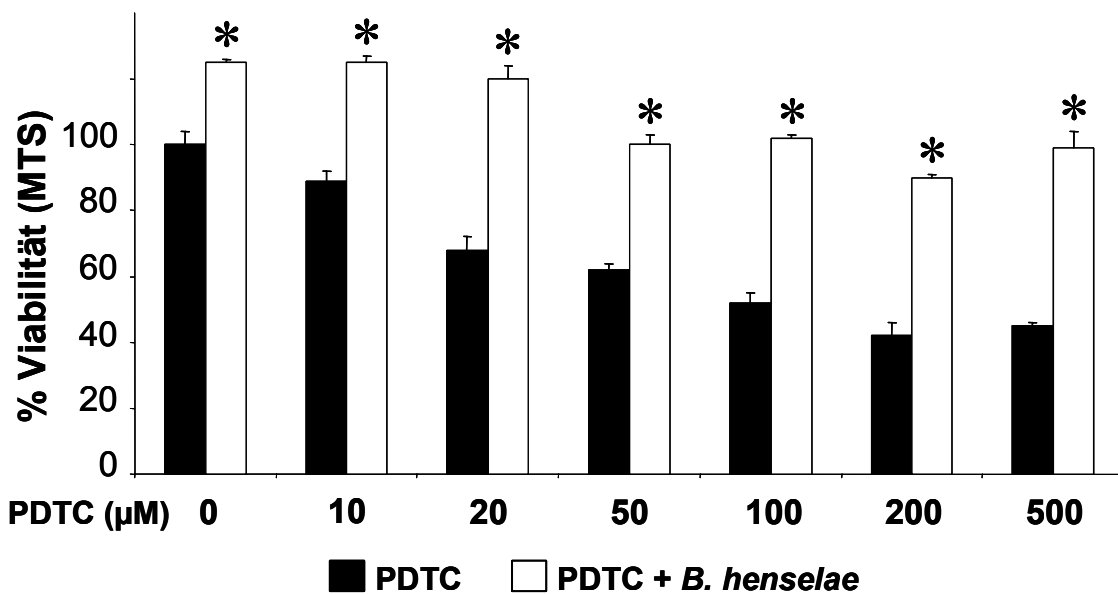


**Abb. 3:** Inhibition der PDTC-induzierten Apoptose in Mono Mac 6-Zellen 24 h nach Infektion mit *B. henselae* (MOI 100). Links: nicht-infizierte Negativkontrolle, Mitte: mit PDTC (200 µM) behandelte Zellen, Rechts: PDTC-behandelte und *B. henselae*-infizierte Zellen; **A.** TUNEL-Assay, konfokale Laserscanning-Mikroskopie. Apoptotische Zellen: FITC-markiert (grün), Skalierung 20 µm. **B.** Prozentualer Anteil TUNEL-positiver Mono Mac 6-Zellen, ermittelt durch Auszählen. **C.** Prozentualer Anteil viabler Mono Mac 6-Zellen gemessen im MTS-Assay. Die Viabilität der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Alle Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen (TUNEL) bzw. Proben (MTS) pro Gruppe dar. \* signifikanter Unterschied zur PDTC-Gruppe mit  $p < 0,05$ .

### 3.2. Titration der PDTC-Konzentration

Um darzustellen, bei welcher Konzentration von PDTC die Apoptoseinhibition durch *B. henselae* am stärksten ist, wurden Zellen infiziert und/oder mit steigenden Konzentrationen von PDTC behandelt. Die Auswertung der Viabilität erfolgte mittels MTS-Assay.

Es zeigte sich, dass die Viabilität durch Behandlung der Zellen mit zunehmenden Konzentrationen von PDTC abnahm. *B. henselae* war bei den niedrigeren Konzentrationen vollständig, bei den höheren nahezu vollständig in der Lage, die Apoptose zu inhibieren (Abb. 4). Der größte Unterschied antiapoptotischer Aktivität von *B. henselae* zeigte sich bei 100-200  $\mu\text{M}$ , weswegen diese Konzentrationen in den weiteren Experimenten genutzt wurden.



**Abb. 4:** Inhibition der PDTC-induzierten Apoptose in Mono Mac 6-Zellen 24 h nach Infektion mit *B. henselae* (MOI 500; prozentualer Anteil viabler Mono Mac 6-Zellen gemessen im MTS-Assay; schwarze Balken: nicht infizierte Kontrolle; weiße Balken: infiziert mit *B. henselae*). Die Viabilität der nicht behandelten und nicht infizierten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. \* signifikante Unterschiede zur jeweiligen PDTC-Gruppe mit  $p < 0,05$ .

### **3.3. Abhängigkeit der Apoptoseinhibition von der Infektionsdosis mit *B. henselae***

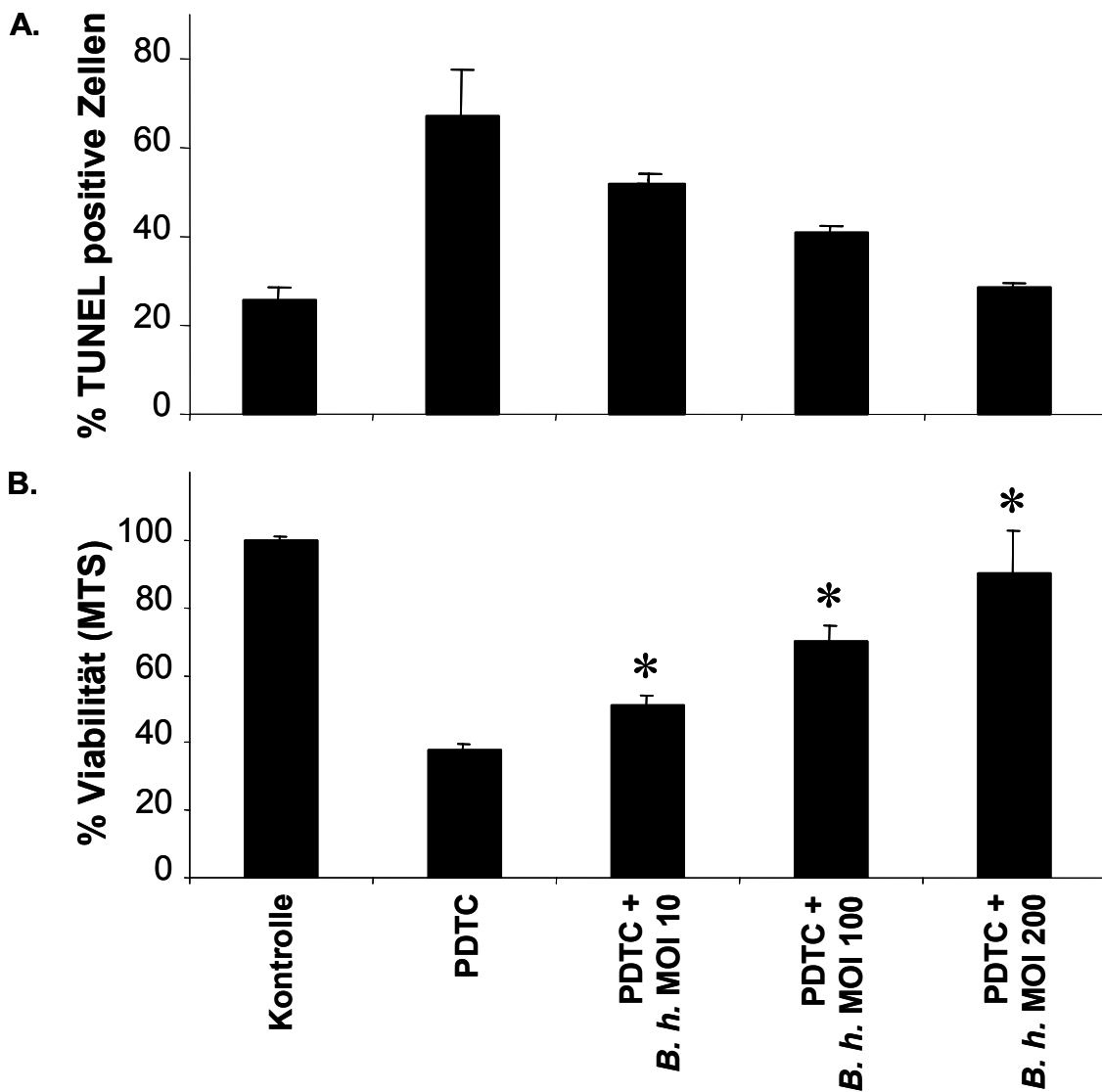
Um zu überprüfen, ob die Fähigkeit von *B. henselae*, die Apoptose von Mono Mac 6-Zellen zu inhibieren, dosisabhängig ist, wurde die Apoptose bei Infektion mit verschiedenen Infektionsdosen (MOI 10, 100, 200) bei gleichen sonstigen Parametern mittels TUNEL- und MTS-Assay untersucht.

Im TUNEL-Assay zeigte sich, dass durch die Behandlung der Zellen mit PDTC 67% und in der Negativkontrolle 24% der Zellen apoptotisch wurden. Durch eine zunehmende Infektionsdosis konnte die Anzahl apoptotischer Zellen auf 52% (MOI 10), 41% (MOI 100) bzw. 29% (MOI 200) (Abb. 5a) gesenkt werden. Man erkennt damit eine von der Dosis von *B. henselae* abhängige Abnahme der Anzahl apoptotischer Zellen. Parallel dazu zeigt sich ein Anstieg der Viabilität im MTS-Assay von 38% (PDTC) auf 51% (MOI 10), 70% (MOI 100) und 90% (MOI 200) (Abb. 5b). Übereinstimmend mit den Daten des TUNEL-Assays erkennt man eine Zunahme der Viabilität bei höherer Infektionsdosis. Daraus kann geschlossen werden, dass die Inhibition der Apoptose durch *B. henselae* tatsächlich von der Anzahl der zugegebenen Bakterien abhängt.

### **3.4. Apoptoseinhibition durch *B. henselae* Houston-1 und *B. quintana* Toulouse**

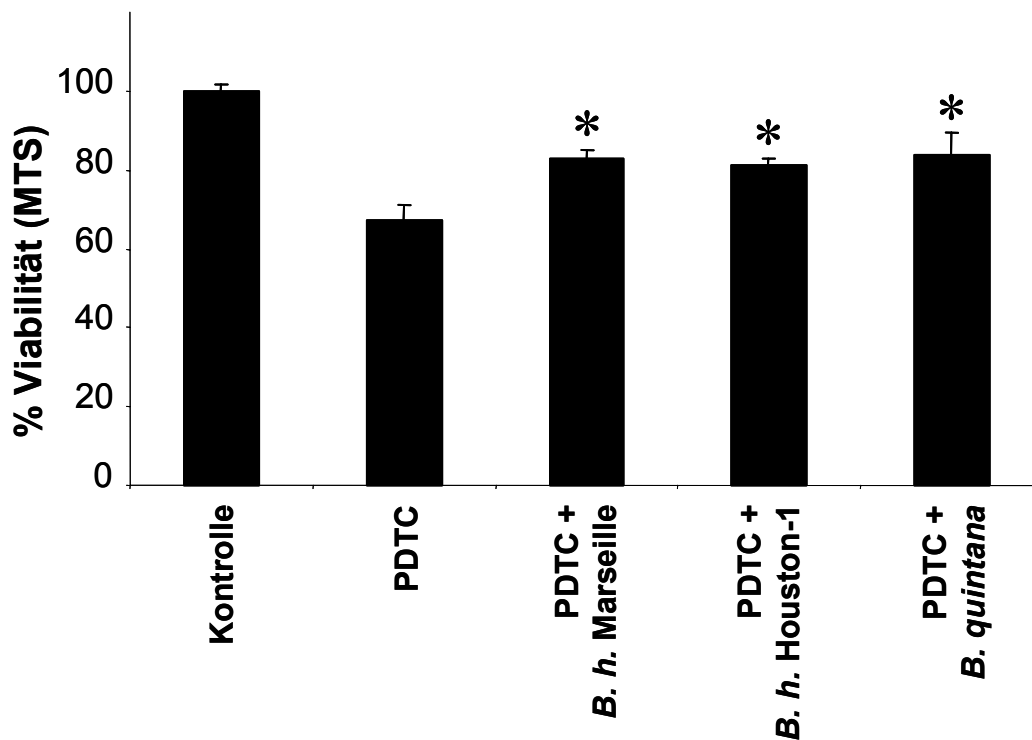
Um zu untersuchen, ob die Fähigkeit zur Apoptoseinhibition spezifisch für den Stamm *B. henselae* Marseille ist, oder ob sich dieser Effekt auch durch *B. henselae* Houston-1 und durch *B. quintana* Toulouse auslösen lässt, wurden Mono Mac 6-Zellen mit diesen zwei Stämmen und *B. henselae* Marseille parallel infiziert. Die Auswertung erfolgte über den MTS-Assay.

Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Stämme die durch PDTC ausgelöste Apoptose vergleichbar inhibierten (Abb. 6). Die Daten zeigen, dass die Fähigkeit, Apoptose in Mono Mac 6-Zellen zu inhibieren, wahrscheinlich verschiedenen humanpathogenen *Bartonella*-Species eigen ist.



**Abb. 5:** Dosis-abhängige Inhibition der PDTC-induzierten Apoptose in Mono Mac 6-Zellen 24 nach Infektion mit *B. henselae* (*B. h.*, PDTC 200  $\mu$ M). **A.** Prozentualer Anteil TUNEL-positiver Mono Mac 6-Zellen, ermittelt durch Auszählen. **B.** Prozentualer Anteil viabler Mono Mac 6-Zellen gemessen im MTS-Assay. Die Viabilität der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Versuchen (TUNEL) bzw. 3 Proben (MTS) pro Gruppe dar. \* signifikante Unterschiede zur PDTC-Gruppe mit  $p < 0,05$ .



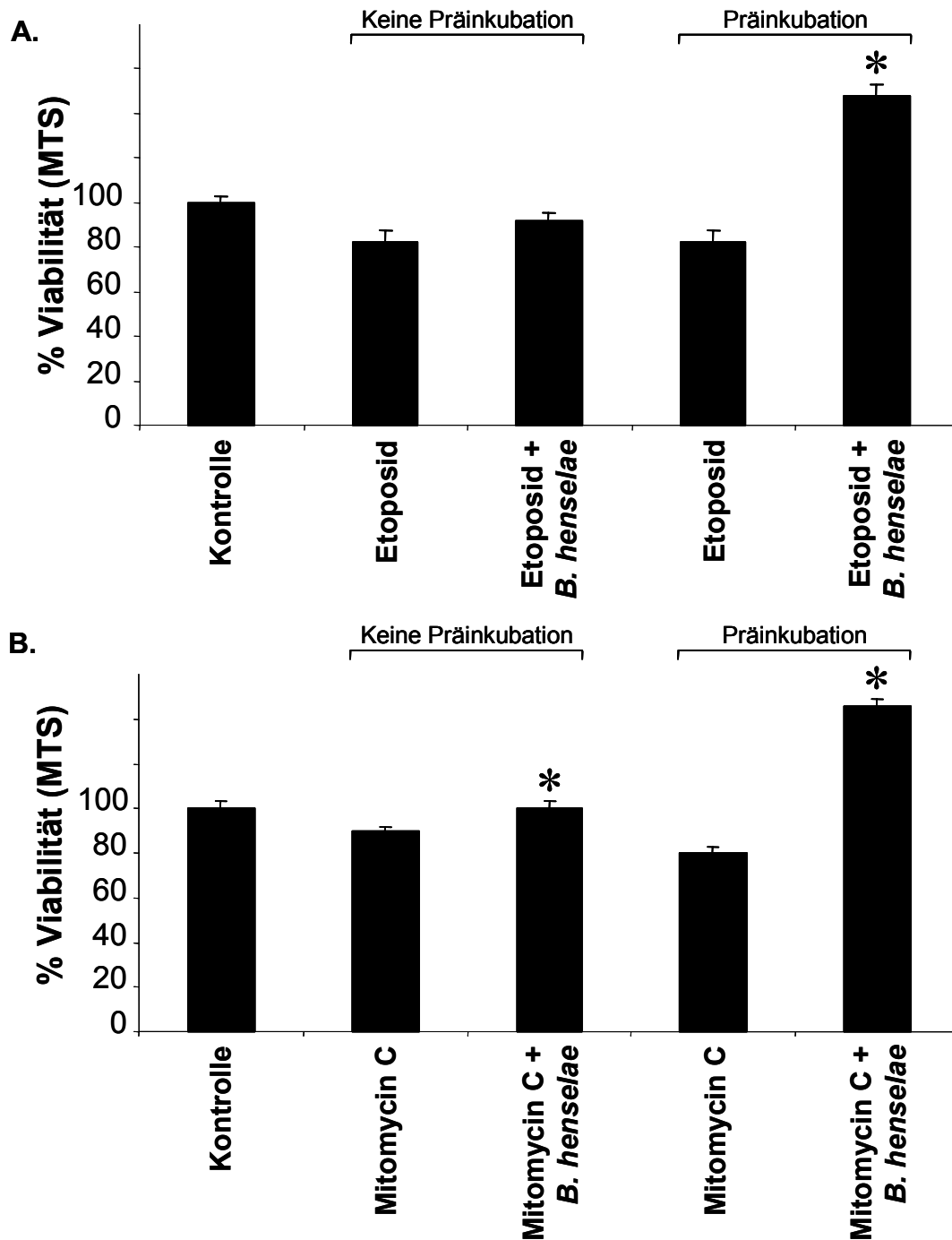


**Abb. 6:** Inhibition der PDTC-induzierten Apoptose durch *B. henselae* Marseille, *B. henselae* Houston-1 und *B. quintana* in Mono Mac 6-Zellen 24 h nach Infektion (MOI 100; PDTC 200  $\mu$ M; prozentualer Anteil viabler Mono Mac 6-Zellen gemessen im MTS-Assay). Die Viabilität der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Proben pro Gruppe dar. \* signifikante Unterschiede zur PDTC-Gruppe mit  $p < 0,05$ .

### 3.5. Inhibition der Etoposid- und Mitomycin C-induzierten Apoptose durch *B. henselae*

Nachdem die durch PDTC ausgelöste Apoptose durch *B. henselae* inhibierbar war, sollten nun zur Induktion der Apoptose andere Substanzen getestet werden. Zudem sollte untersucht werden, ob eine Präinkubation der Zellen mit *B. henselae* die Apoptoseinhibition verbessert.

Dazu wurden als Apoptoseinduktoren Etoposid und Mitomycin C verwendet. Diese Substanzen sind Zytostatika, die über Interkalation in die DNA (73) und eine direkte Caspasenaktivierung in der Lage sind, in Zellen Apoptose auszulösen.



**Abb. 7:** Inhibition der A. Etoposid- (25 µg/ml) bzw. B. Mitomycin C- (25 µg/ml) induzierten Apoptose in Mono Mac 6-Zellen Zellen nach *B. henselae*-Infektion (MOI 10; prozentualer Anteil viabler Mono Mac 6-Zellen gemessen im MTS-Assay). Inkubationszeit 8 h bzw. Präinkubation mit *B. henselae* für 24 h und anschließender Induktorengabe für 8 h. Die Viabilität der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. \* signifikante Unterschiede zur jeweiligen Induktorengruppe mit  $p < 0,05$ .

Die Zellen wurden entweder zusammen für 8 h mit den Induktoren Etoposid bzw. Mitomycin C und *B. henselae* inkubiert, oder sie wurden erst für 24 h mit *B. henselae* infiziert (präinkubiert) und anschließend noch für weitere 8 h zusätzlich mit den Induktoren behandelt.

Bei der Inkubation mit Etoposid und *B. henselae* zeigte sich ein Viabilitätsanstieg von 82% (Etoposid) auf 92% (Etoposid + *B. henselae*), bei der Präinkubation mit *B. henselae* ein Anstieg von 82% auf 148% (Abb. 7a). Bei der Inkubation mit Mitomycin C und *B. henselae* zeigte sich ein Viabilitätsanstieg von 90% (Mitomycin C) auf 100% (Mitomycin C + *B. henselae*), bei der Präinkubation mit *B. henselae* ein Anstieg von 80% auf 146% (Abb. 7b). Es wurde deutlich, dass *B. henselae* auch die durch Etoposid und Mitomycin C induzierte Apoptose inhibiert und dass die Präinkubation mit *B. henselae* die Apoptoseinhibition verbessert.

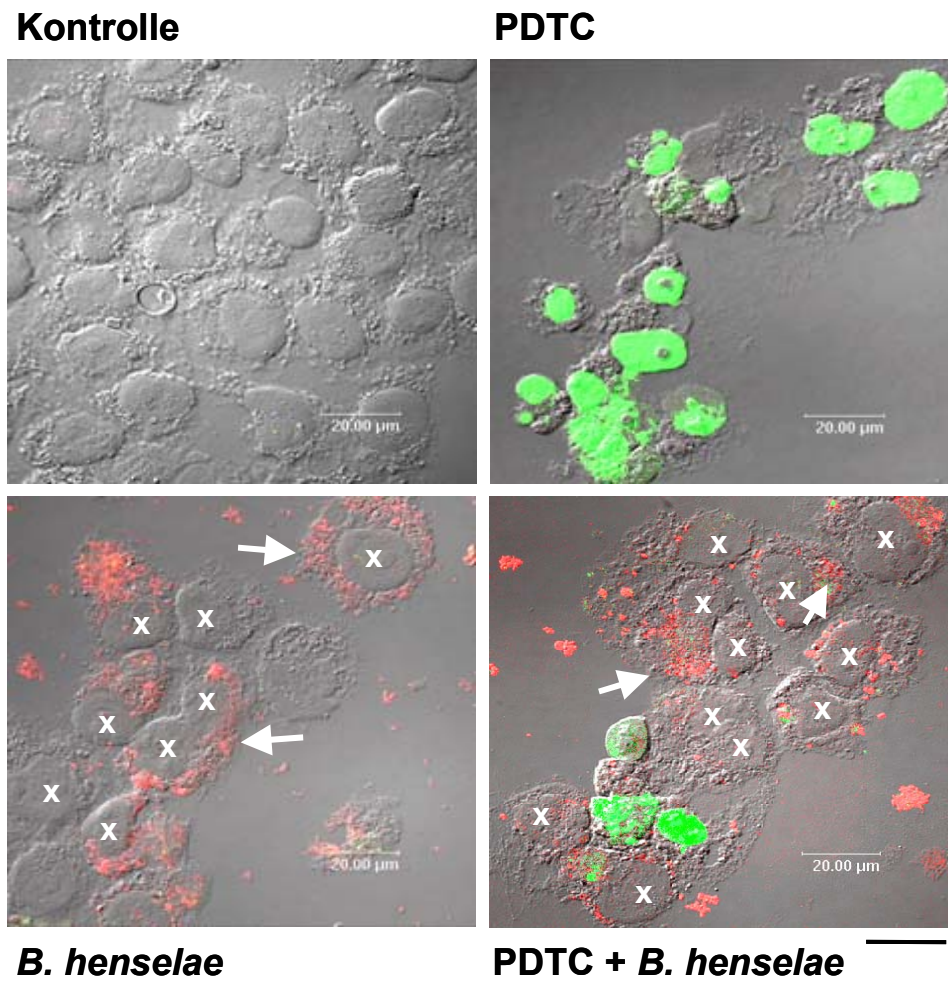
### **3.6. Kolokalisation von *B. henselae*-Infektion und Apoptoseinhibition**

Es wurde diskutiert, dass der apoptoseinhibierende Faktor bei einer *B. henselae*-Infektion von Endothelzellen ein löslicher Faktor zu sein scheint (92). In diesem Fall wäre kein direkter Kontakt von *B. henselae* und Endothelzellen notwendig. Daraus ergab sich die Frage, ob direkter Kontakt zwischen *B. henselae* und den Monozyten nötig ist, um eine Inhibition der Apoptose zu erreichen.

#### **3.6.1. Analyse der Kolokalisation von Apoptoseinhibition und *B. henselae* durch Immunfluoreszenz**

Zur Untersuchung der Frage, ob eine Erregerpräsenz in der Wirtszelle vor Apoptose schützt, wurde bei Infektionsversuchen zusätzlich zu einer TUNEL-Färbung *B. henselae* mittels Immunfluoreszenz gefärbt (Abb. 8).

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergab, dass nahezu alle viablen Zellen, aber nur ein Teil der apoptotischen Zellen infiziert waren (Tab. 14). Man kann daraus schließen, dass Mono Mac 6-Zellen durch die Infektion mit *B. henselae* vor Apoptose geschützt sind und dass dieser Schutz an den direkten Kontakt von *B. henselae* mit der Wirtszelle gebunden ist.



**Abb. 8:** Kolokalisation von PDTC-induzierter Apoptose und *B. henselae*-Infektion durch Kombination von TUNEL-Färbung (FITC, grün) und *B. henselae*-Immunfluoreszenz (TRITC, rot) in Mono Mac 6-Zellen 24 h nach Infektion (MOI 100; PDTC 200 µM), dargestellt in konfokaler Laserscanning-Mikroskopie. Apoptotische Zellen sind grün, *B. henselae* sind rot (Pfeile), *B. henselae*-infizierte Zellen sind mit einem Kreuz gekennzeichnet. Skalierung 20 µm.

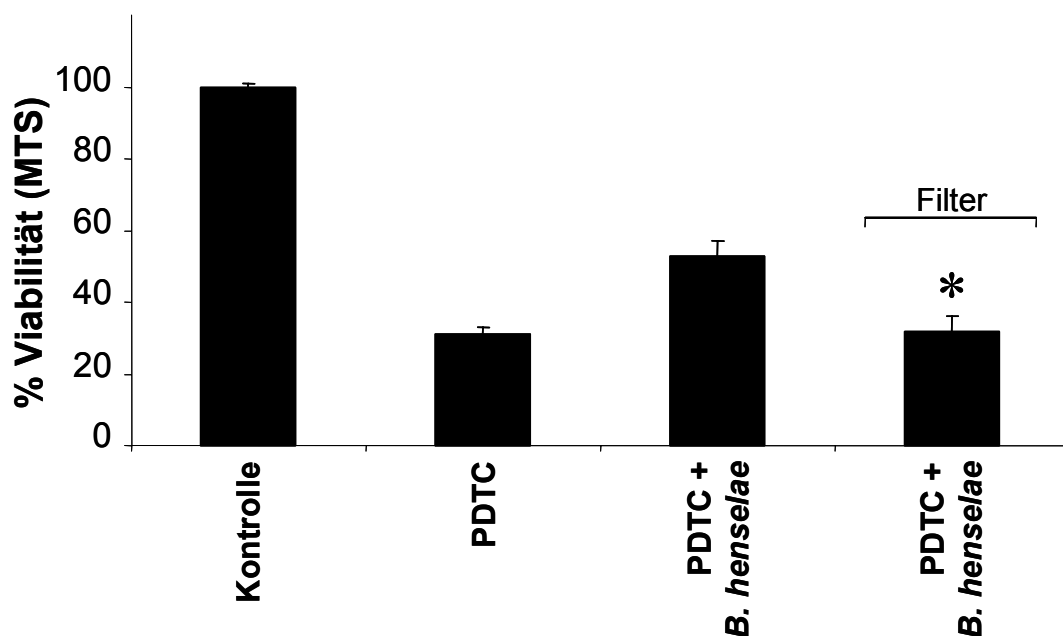
**Tab. 14:** Rate der *B. henselae*-infizierten Zellen nach PDTC-Applikation (in Klammern absolute Zellzahl)

Zellen gesamt: 100% (517)	Anteil infizierter Zellen	Anteil uninfizierter Zellen
Viable Zellen: 86% (445)	94% (417)	6% (28)
Apoptotische Zellen: 14% (72)	47% (34)	53% (38)

### 3.6.2. Analyse der Kolokalisation der apoptoseinhibierenden Eigenschaften von *B. henselae* durch Einsatz eines Zwei-Kammern-Modells

Um die Daten der Immunfluoreszenz in einem unabhängigen Ansatz zu bestätigen, wurden Infektionsversuche durchgeführt, in denen *B. henselae* von den Mono Mac 6-Zellen durch einen Filter (Porengröße 0,4 µm) getrennt war. Als Vergleichsgruppe dienten Mono Mac 6-Zellen, die herkömmlich mit *B. henselae* infiziert wurden. Zu beiden Gruppen wurde PDTC zur Apoptoseinduktion zugegeben. Die Auswertung erfolgte im MTS-Assay.

Es zeigte sich, dass keine Inhibition der Apoptose zustande kommt, wenn *B. henselae* durch Filter an einer direkten Interaktion mit den Wirtszellen gehindert wird (Abb. 9), im Gegensatz dazu wurde die Apoptose durch den Kontakt mit den Bakterien inhibiert. Die Daten zeigen, dass die Kolokalisation *B. henselae* – Mono Mac 6-Zellen wesentlich für die Inhibition der Apoptose ist.

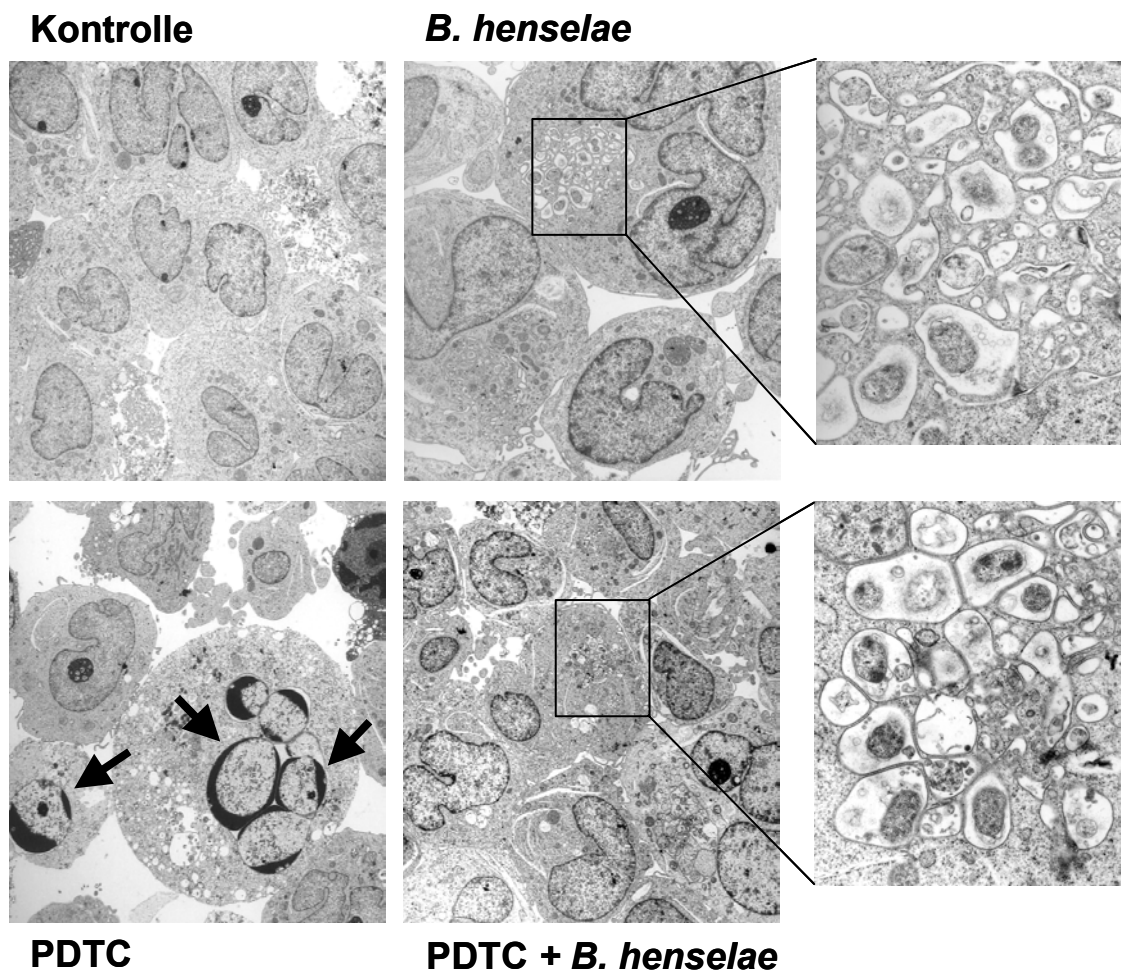


**Abb. 9:** Inhibition der PDTC-induzierten Apoptose in Mono Mac 6-Zellen 24 h nach Infektion mit *B. henselae* (MOI 250; PDTC 200 µM; prozentualer Anteil lebender Mono Mac 6-Zellen gemessen im MTS-Assay). *B. henselae* wurde entweder direkt zu den Zellen gegeben oder durch einen Filter (Porengröße 0,4 µm) von ihnen getrennt. Die Viabilität der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. \* signifikante Unterschiede zur Gruppe „PDTC + *B. henselae*“ mit  $p < 0,05$ .

### 3.6.3. *B. henselae* ist in Mono Mac 6-Zellen intrazellulär in Vakuolen lokalisiert

Es wurden elektronenmikroskopische Bilder erstellt, um zu analysieren, ob die apoptoseinhibierenden Bakterien in den infizierten Zellen im Zytosol oder in Vakuolen lokalisiert sind.

Zu diesem Zweck wurden Mono Mac 6-Zellen mit *B. henselae* infiziert, mit PDTC behandelt und nach 24 h für die Elektronenmikroskopie fixiert. Anschließend wurden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt (Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Schaller, Universitäts-Hautklinik Tübingen).



**Abb. 10:** Elektronenmikroskopische Bilder von Mono Mac 6-Zellen 24 h nach Infektion mit *B. henselae* (MOI 100), PDTC 200  $\mu$ M. Vergrößerungen: Kontrolle 1300-fach, *B. henselae* 2450-fach, Ausschnitt 11900-fach, PDTC 1530-fach, PDTC und *B. henselae* 1380-fach, Ausschnitt 10700-fach. PDTC-behandelte Zellen zeigen apoptotetypische Veränderungen (nukleäre Kondensation, Pfeile). Die Vergrößerungen zeigen, dass *B. henselae* intrazellulär in einem vakuolischen Kompartiment vorliegt.

Die Bilder der Negativkontrolle zeigen viable Zellen. In der Positivkontrolle (PDTC) sieht man typische Veränderungen apoptotischer Zellen: Chromatin-Kondensation, Fragmentierung des Kerns, Ausstülpfen von Membranabschnürungen, Schrumpfen der Zelle sowie die Bildung von intrazellulären Vakuolen und von Apoptosekörperchen. Die Zellen, die mit *B. henselae* infiziert wurden und die, die infiziert und mit PDTC behandelt wurden, sind viabel und zeigen keinerlei apoptosetypische Veränderungen. In der Vergrößerung kann man zudem erkennen, dass intrazelluläre Bakterien in einem membranumhüllten vakuolischen Kompartiment vorliegen (Abb. 10).

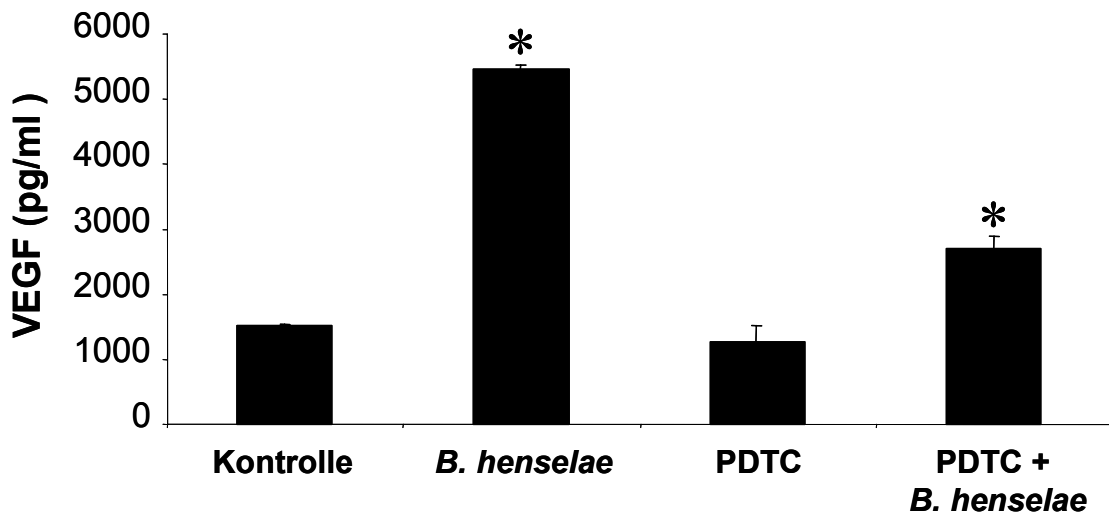
### **3.7. Die Rolle von VEGF in der *B. henselae*-vermittelten Apoptoseinhibition**

*B. henselae* induziert eine Sekretion von VEGF in Monozyten und Epithelzellen (87; 142). VEGF seinerseits inhibiert die Apoptose (48; 63; 123). Deswegen wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten die Rolle von VEGF in der *B. henselae*-induzierten Apoptose untersucht.

#### **3.7.1. Eine *B. henselae*-Infektion induziert VEGF-Produktion in Mono Mac 6-Zellen**

Mono Mac 6-Zellen wurden mit *B. henselae* infiziert und/oder mit PDTC behandelt. Nach der Inkubationszeit wurde die Menge des sekretierten VEGF im Zellkulturüberstand mittels VEGF-ELISA (s. 2.2.5.) bestimmt.

Es zeigte sich, dass *B. henselae* die VEGF-Produktion von Mono Mac 6-Zellen 4-fach steigern konnte (Negativkontrolle: 1514 pg/ml, *B. henselae*: 5465 pg/ml). Auch unter der Anwesenheit von PDTC sezernierten die *B. henselae*-infizierten Zellen signifikant mehr VEGF (PDTC: 1264 pg/ml, PDTC + *B. henselae*: 2712 pg/ml; Abb. 11). Damit lässt sich analog zu den Daten von Monozyten und Epithelzellen (87; 142) zeigen, dass Mono Mac 6-Zellen auf eine Infektion durch *B. henselae* mit einer Produktion von VEGF reagieren.



**Abb. 11:** VEGF-Produktion von Mono Mac 6-Zellen 24 h nach *B. henselae*-Infektion (MOI 100; PDTC 200  $\mu$ M). VEGF wurde im Zellkulturüberstand mittels VEGF-ELISA bestimmt. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. \* signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle mit  $p < 0,05$ .

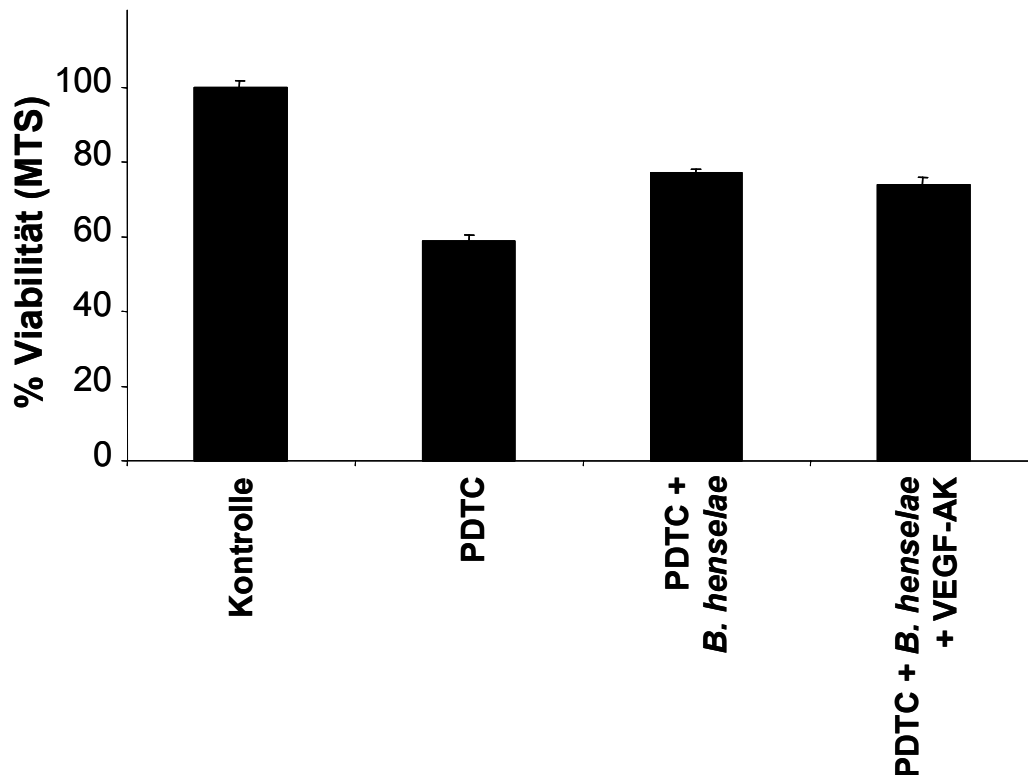
### 3.7.2. VEGF ist nicht verantwortlich für die Apoptoseinhibition durch *B. henselae*

Die antiapoptotische Aktivität, die VEGF auf Endothelzellen hat (63; 123), konnte auch in Mono Mac 6-Zellen durch Zugabe von rekombinantem humanem VEGF (rhVEGF, 10 ng/ml) zu mit PDTC behandelten Zellen gezeigt werden. Außerdem wurde gleichzeitig die Aktivität des VEGF-neutralisierenden Antikörpers (VEGF-Ak, 5 ng/ $\mu$ l) untersucht, indem nach Zugabe von VEGF-Ak zusätzlich zu rhVEGF kein Viabilitätsanstieg mehr sichtbar war (Negativkontrolle: 100%, PDTC: 52%, PDTC + *B. henselae*: 101%, PDTC + rhVEGF: 69%, PDTC + rhVEGF + VEGF-Ak: 46% Viabilität im MTS-Assay).

Im Vergleich mit der apoptoseinhibierenden Wirkung von VEGF auf Endothelzellen sollte im Folgenden untersucht werden, ob VEGF bei Mono Mac 6-Zellen, die mit PDTC behandelt und mit *B. henselae* infiziert wurden, eine antiapoptotische Aktivität entfaltet. Dazu wurden zu einem Zellkulturansatz VEGF-neutralisierende Antikörper gegeben, um den autokrinen Effekt von VEGF auf die Mono Mac 6-Zellen zu inhibieren. Die Viabilität wurde im MTS-Assay bestimmt.



Es zeigte sich, dass Zellen, die mit PDTC und *B. henselae* behandelt waren, ähnlich viabel waren wie Zellen, die zusätzlich mit VEGF-neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden (74% mit VEGF-Ak versus 77%; Abb. 12). Somit ergibt sich, dass die antiapoptotische Aktivität von *B. henselae* nicht durch autokrine Effekte des sezernierten VEGF bedingt ist.

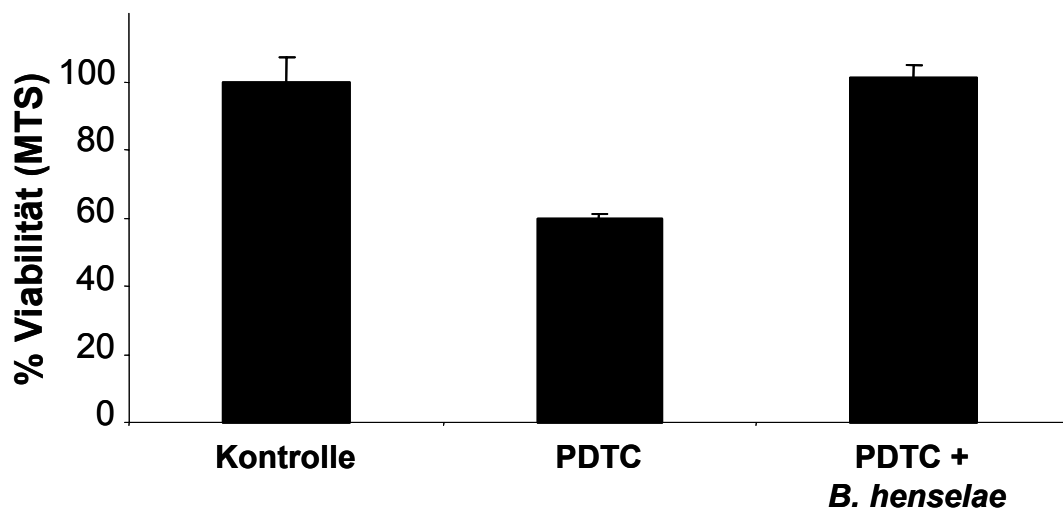


**Abb. 12:** Inhibition der PDTC-induzierten Apoptose in Mono Mac 6-Zellen 24 h nach Infektion mit *B. henselae* bei Zugabe eines neutralisierenden VEGF-Antikörpers (5 ng/ml; *B. henselae* MOI 100; PDTC 200  $\mu$ M; prozentualer Anteil lebender Mono Mac 6-Zellen gemessen im MTS-Assay). Die Viabilität der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Proben pro Gruppe dar.

### 3.8. Apoptoseinhibition durch *B. henselae* in J774.A1-Makrophagen

Um zu zeigen, dass die Apoptoseinhibition durch *B. henselae* nicht auf Mono Mac 6-Zellen beschränkt ist, sondern auch in anderen Makrophagen-Zelllinien auslösbar ist, wurden Experimente mit murinen J774.A1-Makrophagen durchgeführt. Die Zellen wurden mit *B. henselae* infiziert und/oder mit PDTC behandelt. Die Viabilität wurde mittels MTS-Assay bestimmt.

Ganz ähnlich zu Mono Mac 6-Zellen war *B. henselae* auch in J774-Makrophagen in der Lage, die PDTC-induzierte Apoptose zu inhibieren (Abb. 13). Somit scheint es so, dass die Apoptoseinhibition durch *B. henselae* ein generelles Prinzip in Monozyten und Makrophagen darstellt.



**Abb. 13:** Inhibition der PDTC-induzierten Apoptose in J774-Makrophagen 6 h nach Infektion mit *B. henselae* (MOI 200; PDTC 200  $\mu$ M; prozentualer Anteil viabler J774-Makrophagen gemessen im MTS-Assay). Die Viabilität der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Proben pro Gruppe dar.

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

#### 3.9.1. Nachweis der Apoptoseinhibition mittels TUNEL-Assay

Es sollte untersucht werden, ob die durch *B. henselae* bedingte Inhibition der Apoptose ebenfalls in einer epithelialen Zelllinie abläuft. Dazu wurden HeLa-Zellen zur Apoptoseinduktion mit Staurosporin behandelt und mit *B. henselae* infiziert. Nach 4 h Inkubationsdauer wurden die Zellen mittels TUNEL-Assay gefärbt und zur Detektion apoptotischer Zellen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.

Nach Behandlung mit Staurosporin waren 74% der Zellen apoptotisch (Negativkontrolle 0%), die Zugabe von *B. henselae* konnte die Staurosporin-bedingte Apoptose

teilweise aufheben (39%, Abb. 14a,b). Die Daten zeigen, dass *B. henselae* ebenfalls in der Lage ist, die Staurosporin-vermittelte Apoptose von HeLa-Zellen zu inhibieren.

### **3.9.2. Nachweis der Apoptoseinhibition mittels MTS-Assay**

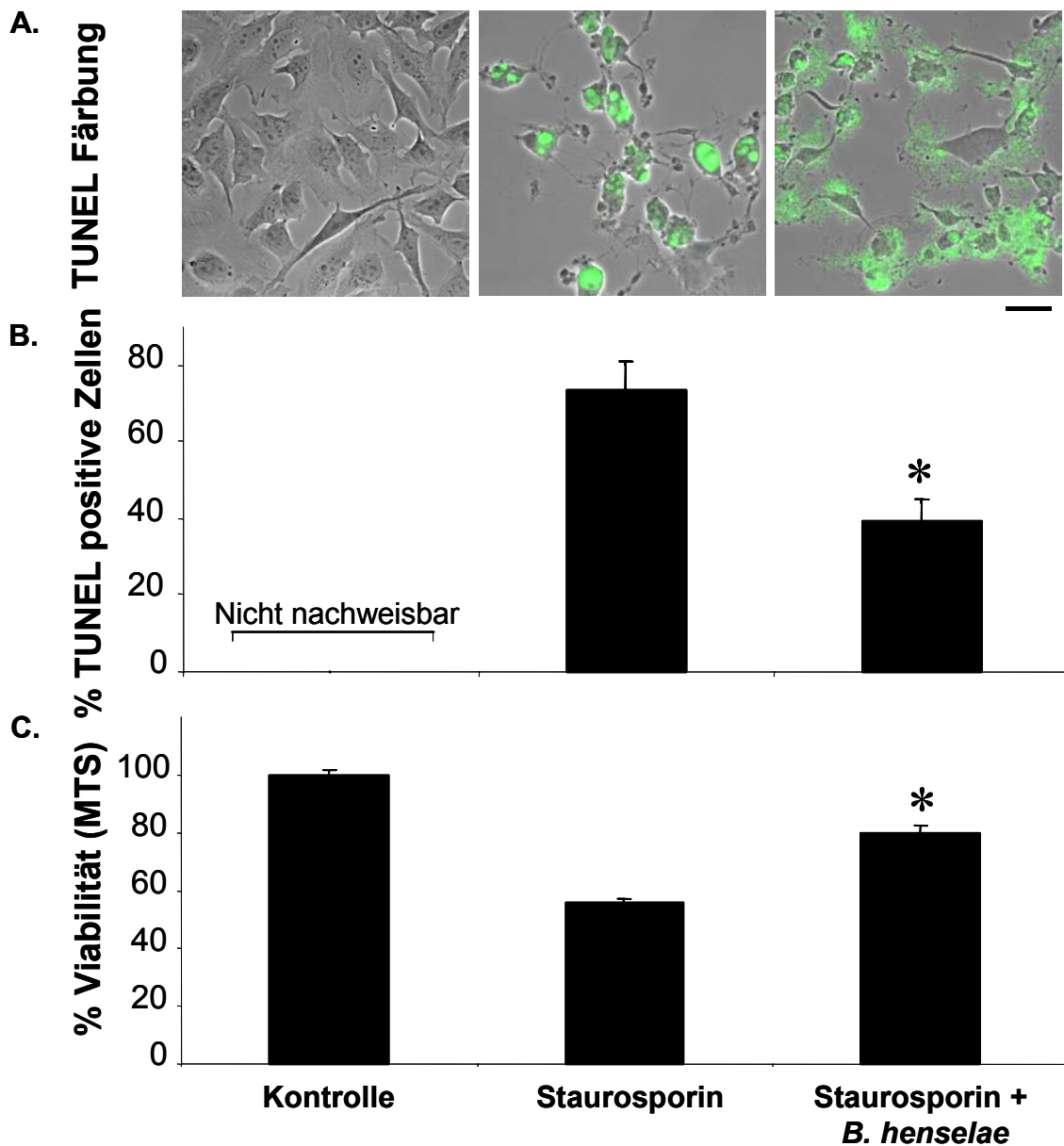
Parallel zu dem unter 3.11. beschriebenen Ansatz wurde die Viabilität der HeLa-Zellen im MTS-Assay bestimmt. Dazu wurde der Versuchsansatz im 96-well-Format durchgeführt, HeLa-Zellen wurden ebenfalls mit *B. henselae* infiziert und mit Staurosporin behandelt.

Es zeigte sich, dass die Zugabe von Staurosporin die Viabilität der Zellen von 100% auf 56% reduzierte. Zellen, die gleichzeitig zur Staurosporin-Behandlung mit *B. henselae* infiziert wurden, zeigten hingegen eine Viabilität von 80% (Abb. 14c). Somit bestätigten die Ergebnisse des MTS-Assays auch hier die des TUNEL-Assays.

### **3.10. Einfluss einer *B. henselae*-Infektion auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B**

PDTC wirkt durch Hemmung von NF- $\kappa$ B apoptotisch (159). Um zu untersuchen, ob *B. henselae* in der Lage ist, diese Hemmung aufzuheben, wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivität nach *B. henselae*-Infektion analysiert. Dazu wurden Zellen mit *B. henselae* infiziert und/oder mit PDTC behandelt. Nach einer Stunde wurden Kernextrakte hergestellt. Diese Extrakte wurden mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) auf Zellkernlokalisation und DNA-Bindungsfähigkeit von NF- $\kappa$ B untersucht.

Nicht infizierte Mono Mac 6-Zellen wiesen in Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen (60; 60; 186) eine geringe konstitutive NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität auf (Abb. 15, Spur 1). Als Positivkontrolle wurde TNF- $\alpha$  zugegeben, das die NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität deutlich erhöhte (Spur 2). Die Behandlung von Mono Mac 6-Zellen mit dem NF- $\kappa$ B-Inhibitor PDTC verringerte die NF- $\kappa$ B-Bindungsaktivität (Spur 4). Die *B. henselae*-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Spur 3) konnte durch Zugabe von PDTC nicht inhibiert werden (Spur 5). Demnach lässt sich vermuten, dass die Inhibition von NF- $\kappa$ B durch eine *B. henselae*-Infektion unterdrückt werden kann.



**Abb. 14:** Inhibition der Staurosporin-induzierten Apoptose in HeLa-Zellen 4 h nach Infektion mit *B. henselae* (MOI 2000). Links: nicht-infizierte Negativkontrolle. Mitte: mit Staurosporin (1  $\mu$ M) behandelte Zellen. Rechts: Staurosporin-behandelte und *B. henselae*-infizierte Zellen. **A.** TUNEL-Assay, Fluoreszenz-Mikroskopie. Apoptotische Zellen: FITC-markiert (grün), Skalierung 40  $\mu$ m. **B.** Prozentualer Anteil TUNEL-positiver HeLa-Zellen, ermittelt durch Auszählen. **C.** Prozentualer Anteil viabler HeLa-Zellen gemessen im MTS-Assay. Die Viabilität der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen (TUNEL) bzw. 4 Proben (MTS) pro Gruppe dar. \* signifikanter Unterschied zur Staurosporin-Gruppe mit  $p < 0,05$ .

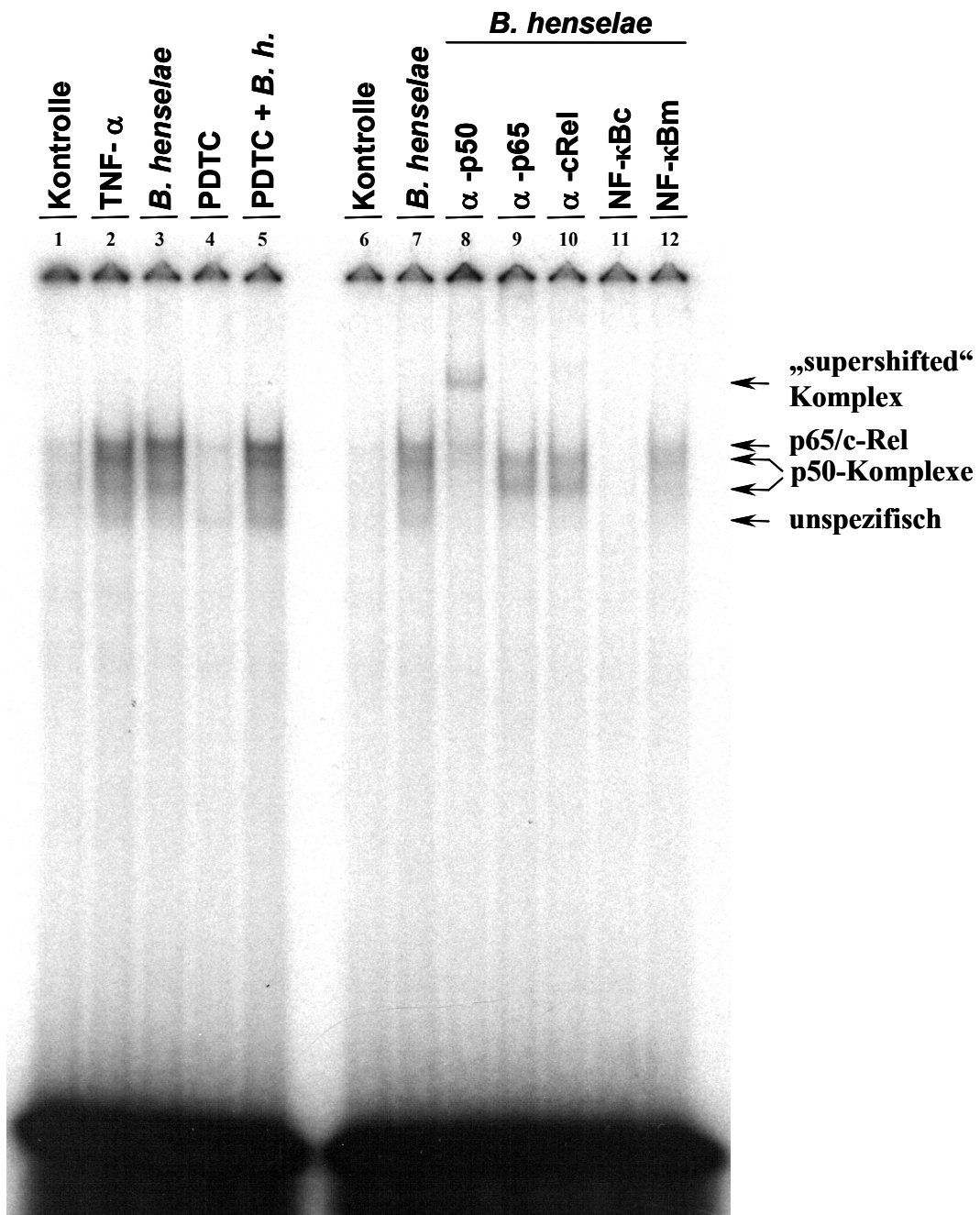
Um die Spezifität der Komplexe zu überprüfen, wurden Konkurrenzexperimente mit unmarkierter Sonde bzw. Supershifts durchgeführt (s. 2.2.9.1.). Es zeigte sich, dass bei Zugabe der unmarkierten NF- $\kappa$ B Konsensus-Sonde keine Banden zu sehen waren (Spur 11). Bei Zugabe der unmarkierten mutierten Sonde zeigten sich alle Banden mit Ausnahme der untersten (Spur 12), woraus sich schließen lässt, dass diese Bande durch unspezifische Bindung der Kernproteine an die Sonde zustande kommt.

Zur Identifizierung der Proteine wurden Supershift-Experimente durchgeführt. Bei Zugabe des Antikörpers gegen p50 zeigte sich eine neue Bande, während zwei andere Banden nicht mehr vorhanden waren (Spur 8); somit konnten diese Banden als NF- $\kappa$ B p50 Homodimer identifiziert werden. Bei Zugabe von Antikörpern gegen p65 bzw. c-Rel war jeweils die oberste Bande nicht mehr sichtbar (Spur 9/10), somit konnte diese Bande als p65/c-Rel-Heterodimer identifiziert werden.

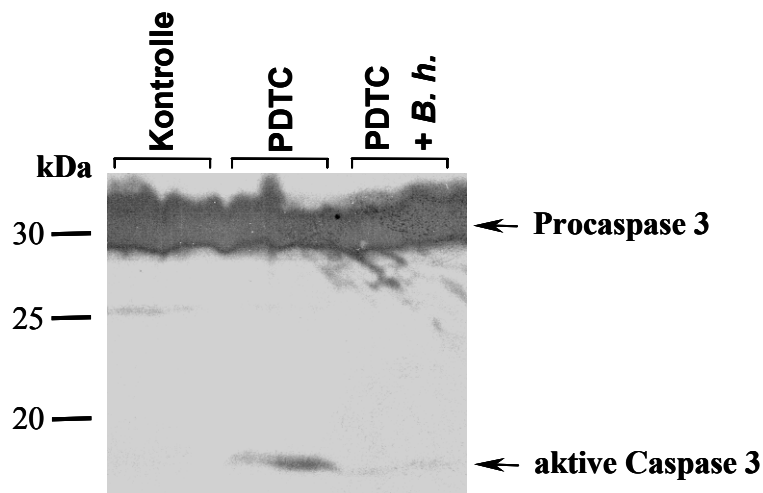
### **3.11. Einfluss einer *B. henselae*-Infektion auf die Aktivität von Caspase 3**

Die Aktivierung von Caspasen spielt eine wichtige Rolle in der Apoptose, insbesondere die von Caspase 3 als Effektorcaspase. Caspase 3 liegt in der Zelle als inaktive Proform mit einer Proteingröße von 32 kDa vor. Durch Proteolyse wird die Procaspase in aktive Caspase 3 (17 kDa) umgewandelt. Um zu untersuchen, ob sich nach Infektion mit *B. henselae* eine Reduktion der Aktivierung von Caspase 3 zeigt, wurden Mono Mac 6-Zellen mit *B. henselae* infiziert und/oder mit PDTC behandelt. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Proteine aus den Zellen isoliert und mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde ein Immunoblotting mit einem Antikörper gegen Caspase 3 durchgeführt (s. 2.2.11.).

In der Kontrolle ist nur Procaspase 3 (32kDa) sichtbar (Abb. 16). PDTC-behandelte Mono Mac 6-Zellen zeigen ebenfalls noch die 32 kDa-Form der Procaspase 3, aber auch aktive Caspase 3 (17 kDa). Bei mit PDTC behandelten und mit *B. henselae* infizierten Mono Mac 6-Zellen zeigt sich eine deutliche Reduktion der aktiven Caspase 3 (17 kDa). Diese Daten zeigen, dass durch Infektion mit *B. henselae* die Aktivierung von Caspase 3 durch PDTC unterdrückt wird.



**Abb.15:** EMSA: Bestimmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in nukleären Extrakten von Mono Mac 6-Zellen 60 min nach Infektion mit *B. henselae* (MOI 100; TNF- $\alpha$  50 ng/ml; PDTC 200  $\mu$ M). In Konkurrenzexperimenten wurden die nukleären Extrakte von durch *B. henselae* infizierten mit der radioaktiv markierten Sonde in Gegenwart der unmarkierten Oligonukleotide NF- $\kappa$ B Konsensus (NF- $\kappa$ Bc) bzw. NF- $\kappa$ B Mutiert (NF- $\kappa$ Bm) inkubiert. Supershift-Experimente wurden mit polyklonalen Antikörpern, die Rel-Proteine (p50, p65, c-Rel) erkennen, durchgeführt.



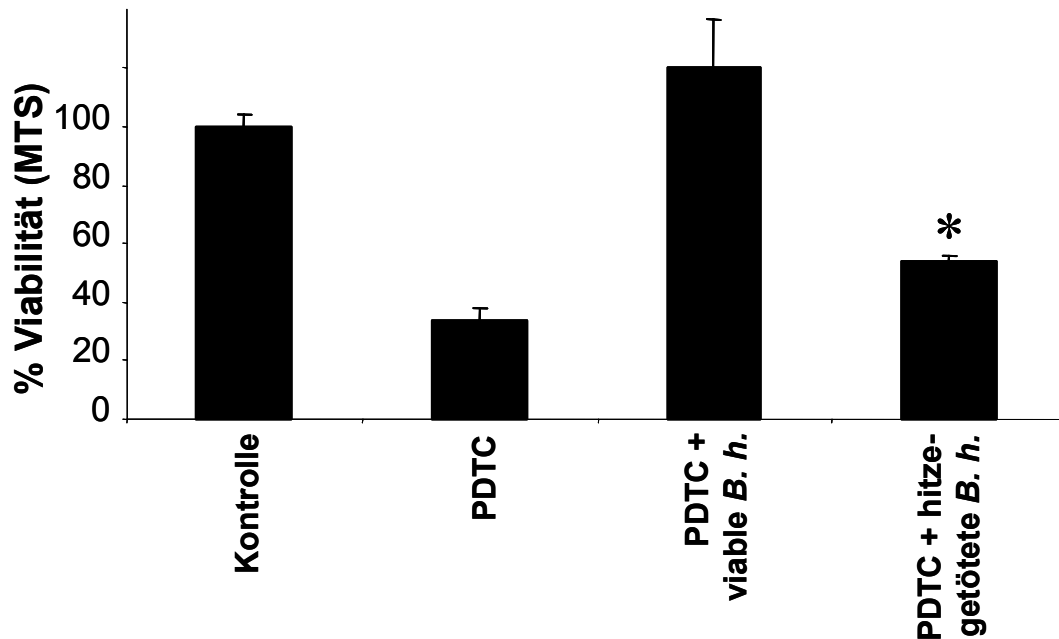
**Abb.16:** Aktivität von Caspase 3 24 h nach Infektion mit *B. henselae* (MOI 100; PDTC 200  $\mu$ M). Der Immunoblot zeigt die Position von Procaspase 3 (32 kDa) und von aktiver Caspase 3 (17 kDa).

### 3.12. Untersuchungen der bakteriellen Faktoren, die die Apoptoseinhibition beeinflussen

Da sehr wenig über die Natur der apoptoseinhibierenden Mechanismen von *B. henselae* bekannt ist, sollte zunächst untersucht werden, ob die Fähigkeit, Apoptose zu inhibieren, an die Viabilität von *B. henselae* gekoppelt ist.

#### 3.12.1. Der Effekt von hitzegetöteten *B. henselae* auf die Apoptoseinhibition

Mono Mac 6-Zellen wurden parallel mit viablen und hitzegetöteten *B. henselae* infiziert und/oder mit PDTC behandelt. Die Viabilität der Mono Mac 6-Zellen wurde im MTS-Assay gemessen. Die hitzegetöteten Bakterien wurden vier Wochen auf Columbia-Agarplatten bebrütet, um die Abtötung zu kontrollieren. Es wurde kein bakterielles Wachstum beobachtet. Es resultierte ein Viabilitätsanstieg von 34% (PDTC) auf 120% (viable *B. henselae*) bzw. 54% (hitzegetötete *B. henselae*; Abb. 17). Somit zeigte sich, dass hitzegetötete Bartonellen zwar nur zu einem geringeren Teil als viable Bakterien zur Inhibition der Apoptose fähig sind, jedoch immer noch eine gewisse Fähigkeit zur Apoptoseinhibition haben. Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass der zur Apoptoseinhibition führende bakterielle Mechanismus zum Teil auf präformierte Faktoren (z.B. Proteine) zurückgeführt werden kann.



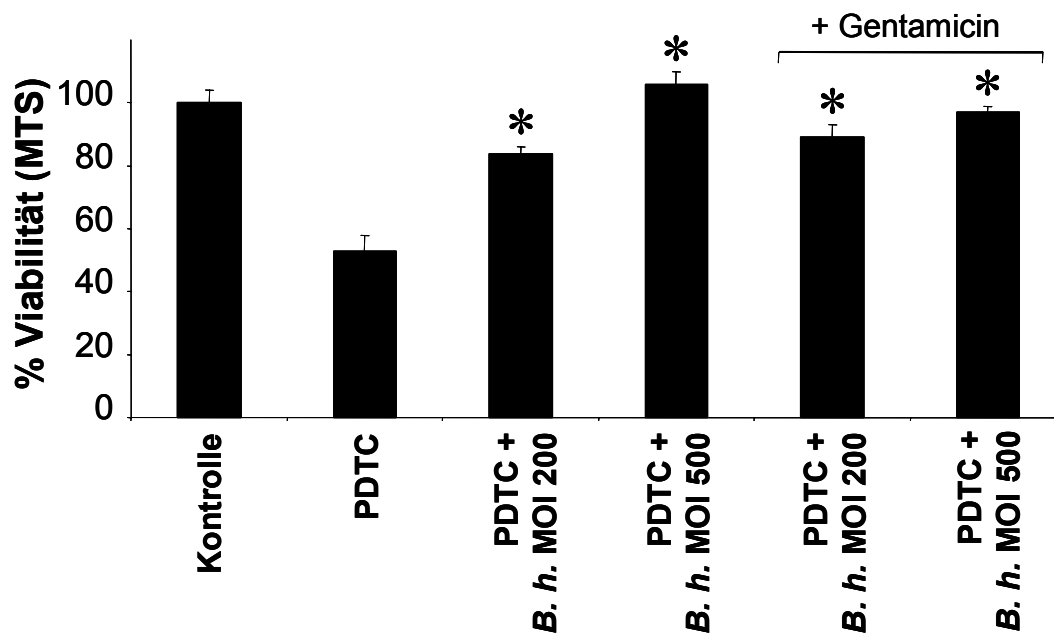
**Abb. 17:** Inhibition der PDTC-induzierten Apoptose in Mono Mac 6-Zellen 24 h nach Infektion mit viablen bzw. hitzegetöteten *B. henselae* (*B. h.*); (MOI 100; PDTC 200  $\mu$ M; prozentualer Anteil viabler Mono Mac 6-Zellen gemessen im MTS-Assay). Die Viabilität der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. \* signifikanter Unterschied zur Gruppe „PDTC + viable *B. henselae*“ mit  $p < 0,05$ .

### 3.12.2. Der Effekt von Gentamicin-behandelten *B. henselae*

Mono Mac 6-Zellen wurden parallel mit viablen *B. henselae* infiziert sowie mit solchen, die zuvor 2 h in Gentamicin-haltigem Medium inkubiert worden waren. Die entsprechenden Versuchsgruppen wurden zusätzlich mit PDTC behandelt. Die Viabilität der Mono Mac 6-Zellen wurde im MTS-Assay gemessen. Die Gentamicin-behandelten Bakterien wurden vier Wochen auf Columbia-Agarplatten bebrütet, um die Abtötung durch Gentamicin zu kontrollieren. Es wurde kein bakterielles Wachstum beobachtet.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch Gentamicin getötete *B. henselae* genauso zur Inhibition der Apoptose fähig sind wie viable Bakterien (Abb. 18). Diese Daten zeigen, dass die apoptoseinhibierenden Mechanismen in diesem Modell auf präformierten Faktoren (z.B. Proteinen) beruhen.





**Abb. 18:** Inhibition der PDTC-induzierten Apoptose in Mono Mac 6-Zellen 24 h nach Infektion mit viablen bzw. Gentamicin-getöteten *B. henselae* (*B. h.*) (PDTC 200  $\mu$ M; prozentualer Anteil viabler Mono Mac 6-Zellen gemessen im MTS-Assay). Die Viabilität der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Proben pro Gruppe dar. \* signifikante Unterschiede zur PDTC-Gruppe mit  $p < 0,05$ .

### 3.12.3. Genetische Untersuchungen zu den apoptoseinhibierenden Faktoren von *B. henselae*

Die Untersuchung bereits vorhandener Transposon-Mutanten von *B. henselae* (144) sollte Aufschluss darüber geben, welche Gene von *B. henselae* an der Inhibition der Apoptose beteiligt sind. Dazu wurden 260 Klone einer Tn903-Transposon-Bank (144) einem Screening unterzogen, um zu bestimmen, bei welchen Mutanten eine veränderte Fähigkeit zur Apoptoseinhibition vorliegt.

#### 3.12.3.1. Screening einer Transposon-Mutanten-Bank von *B. henselae* auf verminderte Apoptoseinhibition

Es sollte überprüft werden, ob Transposon-Mutanten von *B. henselae* vorliegen, die gegenüber *B. henselae* Wildtyp ein verändertes Verhalten bezüglich Apoptoseinhibition zeigen. Dazu wurden die Mutanten angezüchtet und über Messung der optischen Dichte

bei 550 nm mit Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt (s. 2.2.1.4.). Im 96-well-Format wurden Mono Mac 6-Zellen mit PDTC (200 µM) behandelt und/oder mit MOI 100 und 200 infiziert. Nach 24 h Infektionsdauer erfolgte die Auswertung im MTS-Assay. Insgesamt wurden nach diesem Verfahren 260 Mutanten untersucht. Die Mutanten, deren Fähigkeit zur Apoptoseinhibition in den Screening-Experimenten am geringsten ausgeprägt war, wurden danach drei weitere Male untersucht.

Es zeigt sich, dass fünf Mutanten (Klone 42, 188, 226, 227 und 232) eine verminderte Fähigkeit zur Apoptoseinhibition gegenüber dem Wildtyp aufweisen (Abb. 19a). Den stärksten Verlust weist Klon 42 (63 %) auf. Zum Vergleich zeigt Abb. 19b einige Mutanten, die eine größere Fähigkeit zur Apoptoseinhibition als der Wildtyp bzw. gleiche Apoptoseinhibition wie der Wildtyp aufweisen.

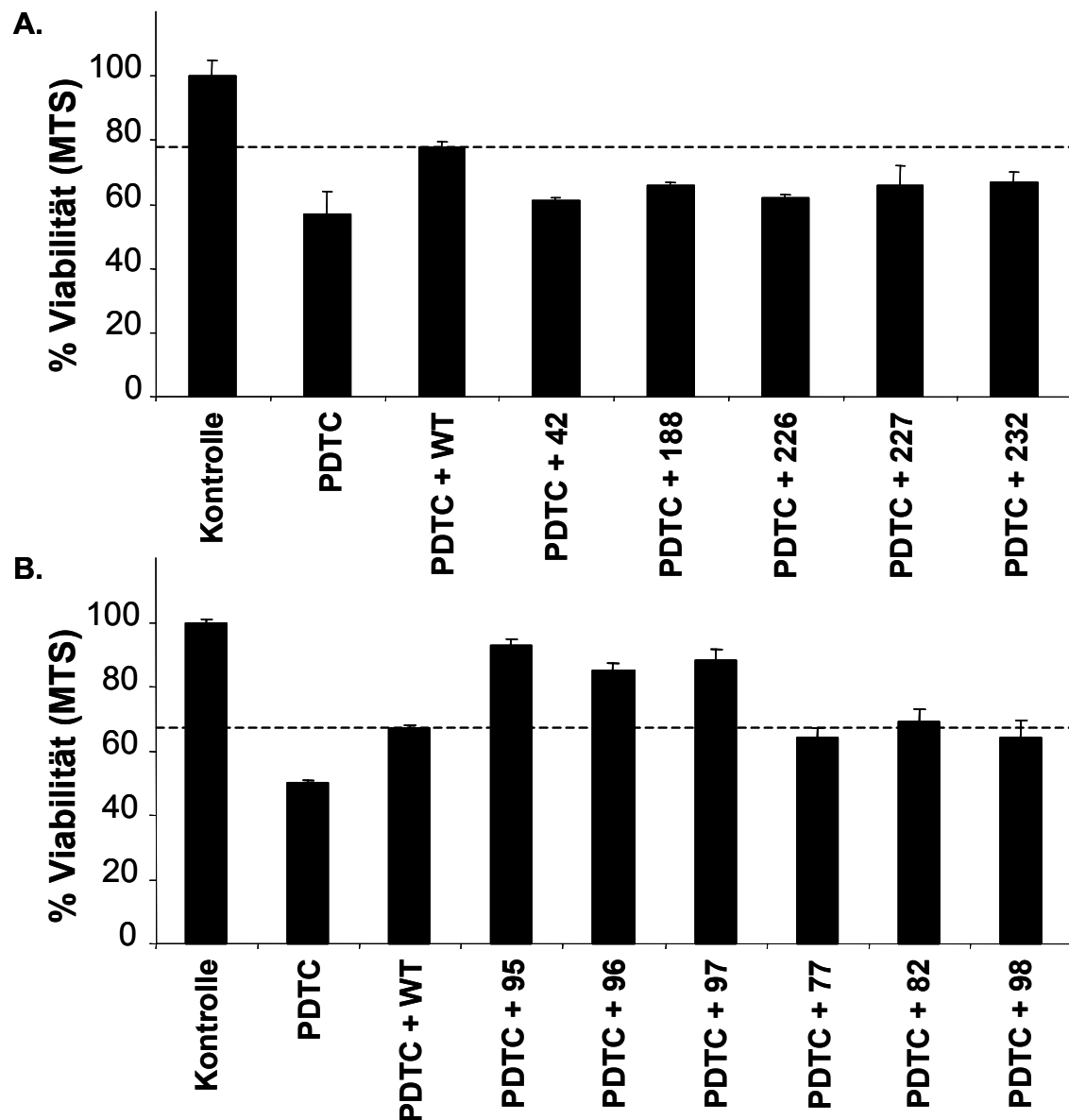
### **3.12.3.2. Analyse der Tn903-Insertionsstelle der Transposon-Mutanten 42, 188, 226, 227 und 232**

Um herauszufinden, in welches Gen das Transposon inseriert war, wurde die chromosomale DNA der Mutanten isoliert (s. 2.2.7.) und die Insertionsstelle durch chromosomale Sequenzierung aus dem Transposon in 5'- und in 3'-Richtung ermittelt (GATC Biotech AG, Konstanz).

Als Sequenzierprimer wurden die Primer <KAN-2>FR-1 und <KAN-2>PR-1 verwendet (s. 2.1.14). Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tab. 15 aufgelistet. Die Sequenzierung ausgehend vom Transposon in 5'-Richtung der Mutante 232 lieferte schlechte DNA-Sequenzen (Elektropherogramm mit vielen Artefakten), deswegen ist in Tab. 15 nur die DNA-Sequenz in 3'-Richtung angegeben.

Mit den DNA-Sequenzen wurde mittels BlastX ([www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST)) nach der Position der Transposon-Insertion gesucht. Es zeigte sich, dass alle Insertionsstellen in 5'-Richtung von Genen liegen, die Homologien zu hypothetischen Proteinen von *Brucella* ssp., *Neisseria gonorrhoeae* und *Plasmodium falciparum* (Details siehe Tab. 15) aufweisen. Weiterführende Untersuchungen zur Funktion dieser Gene in der Inhibition der Apoptose werden in Zukunft durchgeführt werden. Von Mutante 42 war bereits bekannt, dass sie das nicht fimbrielle Adhäsion BadA (vormals „Pilus“) nicht exprimiert (143).

## 3. Ergebnisse



**Abb. 19:** Inhibition der Apoptose durch *B. henselae*-Transposon-Mutanten in Mono Mac 6-Zellen 24 h nach Infektion (MOI 100; PDTC 200  $\mu$ M; prozentualer Anteil lebender Mono Mac 6-Zellen gemessen im MTS-Assay; WT: Wildtyp). Die Viabilität der nicht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 2 Proben pro Gruppe dar. **A.** Mutanten, die weniger Apoptoseinhibition zeigen als der Wildtyp; **B.** Mutanten, die eine vermehrte bzw. ähnliche Apoptoseinhibition zeigen.

**Tab. 15:** Nukleotidsequenzen mit der Transposon-Insertionsstelle der TN903-Mutanten mit verminderter Fähigkeit zur Apoptoseinhibition. Insertionsstelle des Transposons im Genom.

Mutante	Nukleotidsequenz (Die Insertion des Transposons ist durch –Tn903- angegeben)	Position der Transposon-Insertion
42	siehe (143)	BadA (nicht fimbrielles bakterielles Adhäsionsmolekül <i>Bartonella</i> Adhäsion A (143))
188	5' –CGATGTAAGAATGATGAGAGTGCAATCAGTAAATGAAGAGATGTTGTTTTGTTTGGCTGGCAAATTGCAATGATTACAGGCATTGCAAATGCTTATAATGAAGATATTCGTGTTATTTTATATCTTATGTAAAATGACTTTTGATAGAAAAAGCGATTAAAAATCTTCTTGAATAGTGCAAAGGTGTAACAATTGCTTCTCAATTATAAGAATTCACACACAATGAGAAGCTGTGCAGACAATGTTACAAATGCAAGTTACTCTCTTGATTCAAATATGTTTTGCTTGAAGCTGCAGATCTTCGTTAGAGGGACGTATTTCAAGCGCGATATGAAAGATTATGTGAAACAATCTGTAGTTAAAAATATAAAATAAGAGAGGGATAAAAATCGTGAATAAAGCCACAATAC– <b>Tn903</b> –TTCCAAGTGTGTTTCAAATGAACAATGGATCATTAAAGGCGCTTTTTCACTTTTCTGGAAAACAAAACCTTTATGGGCATCTTCTTCAGCAAGTGCCTTTACTGTAACACCAGGACCATTAACAACACGCACACACACATTACTTCCAGGAACAGCAAAGTGTGTTGTCTCACCTTGTGTTAAAATAAAATGGGTGCCACACCGGTATAAGCAGGTGGTGTACCCTAACATCAATGCGCATGGATGCTTCATCGACGAGAGGACGTAATCAAACGCATCTACTAAACGCCCTCTAAAGAGCCAAAAGAAAACATAAAGCACAGACAAAAGGAGAATACATACAGTCCATAAGA–3'	nicht kodierender Bereich in 5'-Richtung eines Genes, das Homologien zu einem hypothetischen Protein von <i>Brucella suis</i> aufweist (65%)
226	5' –AATACTCCACCCCTCAAGCATCACCTCTTTAGCCTCCCGCTCGCAAGAGGAGGCATTTTTTGCAATCACCGGCACAATCTCCACACGTGAATTTGTTTAAATATCACCCACCTGCTTTCTCCGGTAACTTGCACAAAACAAAATCTTTACAGAAGCGAAAACTGTTTACACGGCACACATATCAAC– <b>Tn903</b> –CACTTGGAACGTTCAATAGATTTGCTTGTGTGCATCACGTATAAGCAACTCAAGTGGTCTTTGCAGATGATTAAGGACCAGCATCCAAAAGTTCGTTGGTTGGAAAACACAGGCGAATTTGACTGGTTCATTAGAGCTTCAATATGAGTTGGAAAGATGATTAAGGAGTGACAAAAGGCTTTTGTGAAATAGAAATCGCTTCTTGATCAGCACAAGGCGCTACTTCTTTATAGGGCACCGGAAATAACACTTCTTCTCCACGTGGTGGAAAGGTAATAATGCGGACGGTGACGGATGTATCAGTGCATCCATGGGCTGGTTCGG–3'	nicht kodierender Bereich in 5'-Richtung eines Genes, das Homologien zu einem hypothetischen Protein von <i>Brucella melitensis</i> aufweist (61%)
227	5' –AGAAAGTTGTCTCTGTATGTTTTGGTTAATCTTTTCAATGGCATATGTGCAATAGCACTTGCAATCTCTGGCTTTGACATAACTTTAGCAATGAAGGTCCTTCTTGTGTTTGAATGGGGAATGGTCTCCATCATCTTTTGAACACATTCCTCCCATTTTCAAATCAACACGCTTTGGAAACTGCCTCCCTTGATAAAACCATGGGTCAAGATTTGTTTCTTTCCAAACAGTGTGTAAGTACGCGCGTGTGTTTTGTTTTGCTTTAAAAAATTTAAGAGGCAAGGAGTCCAGAACCAATGAGATCTGTCTCAAGAAACCTTGTGTGCTGCTTTTCTTTAATATAAACACCTCTTC– <b>Tn903</b> –CATATCAACTTTTCCAGTAAAACTGGTCATAAGCTAAGAACAACACGACAACCTTCAAAAACCATGGCGTCCAAAAATCACGCGTTCCCAAGGCTCCAAAACTTTCAAACATCATAACAAATACTCCACCCCTCAAGCATCACCTCTTTAATCTCCGCTCGCAAGAGGAGGCATTTTTTGAATCACCGGCACAATCTCGACACGTGAAATTTGTTTTAACATCACCACTGCTTCTCCGGTAACTTGCAAGGCAATACTTTAGCCAGCAGCGAAAAAAGGCACAGGATTTAATGCATGATATTGAAGATAAGACACCAGCCATCTTACCATAGTGATATCCAGCTTGCCTGCACTGTAAGAAGGCCTCATTAAGCGCTTT–3'	nicht kodierender Bereich in 5'-Richtung eines Genes, das Homologien zu einem hypothetischen Protein von <i>Neisseria gonorrhoeae</i> aufweist (49%)
232	5' – <b>Tn903</b> –CCACAATACTGTTTCTTTGTATACTGGACTGTTACTGGTTGCGAAAAAATTTATAGCGTAGAAGAGTTAAAAAATTTGAAAATTAATTCGATGAATGGGGGAAAAATGTGAAAAACAGAGCCATCTGTACGGTTGTGCCTCAATCGAAAAATTTTTCAGAACTTTATTAAGCCCTTTGTGAACCTCTTAGAAGGATGAGATAAGGCATAAAAGAAATAAGATTCAAACTTTTCTGAAGTTGAAAAAGAGCAAGAGAGCAGTGACATTAATAACAAAAATAAGTGACAATGTTGTTTTTCTTTTTCAAGTGAGAGATCATTTAATTTGAATATGATATGGGTTTCAATAGTTGAAAATTTCTCTC–3'	nicht kodierender Bereich in 5'-Richtung eines Genes, das Homologien zu einem hypothetischen Protein von <i>Plasmodium falciparum</i> aufweist (52%)

#### **4. Diskussion**

Eine Infektion mit *B. henselae* kann in gutartigen Gefäßtumoren (Bazilläre Angiomatose, Peliosis hepatis) resultieren. Vor allem immunkompromitierte Patienten leiden unter diesen Erkrankungen. Deren Zahl nimmt dadurch, dass die Anzahl der HIV-Patienten stetig ansteigt, sowie durch iatrogen verursachte Immundefizienz (z.B. Knochenmarkstransplantationen) ständig zu. Somit wird es immer wichtiger, opportunistische Infektionen zu erkennen und sie zu behandeln. Speziell *B. henselae* als fakultativ intrazellulär lebender Erreger kann wichtige Informationen liefern, um Wirt-Pathogen-Interaktionen zu verstehen und Rückschlüsse auf grundlegende Funktionen des menschlichen Immunsystems einerseits und auf mikrobielle Ausweichstrategien andererseits zu ziehen.

*B. henselae* invadiert in Endothelzellen und benutzt wahrscheinlich diese vor dem Immunsystem geschützte intrazelluläre Nische zur Replikation (89). Die infizierten Wirtszellen ihrerseits proliferieren schneller (38) und bleiben länger viabel (96), was durch verschiedene Mechanismen zustande kommen kann. Erstens ist *B. henselae* in der Lage, die Sekretion von VEGF in einer Vielzahl verschiedener Wirtszellen (Ea.hy 926-Zellen (Fusion aus Lungenkarzinom- und Endothelzellen), HeLa-Zellen (Zervixkarzinom-Zellen) und THP-1 Zellen (Monozytenzelllinie) auszulösen (87; 142). Dieses sekretierte Mitogen, ein grundlegender Faktor der Angiogenese, regt seinerseits Endothelzellen zum Wachstum an (202). Zweitens verhindert die Infektion mit *B. henselae* die Apoptose von Endothelzellen (92; 156), und drittens stimuliert die Infektion durch *B. henselae* die Proliferation von Endothelzellen direkt (38). Somit moduliert *B. henselae* über mindestens drei synergistisch wirkende Mechanismen die Proliferation von Endothelzellen. Entsprechend sind die von *B. henselae* induzierten Krankheitsbilder der BA und der PH durch pathologische Gefäßproliferationen gekennzeichnet. Diese Endothelzellproliferationen sind kapillär aufgebaut und durch epitheloide Endothelzellen, die Blutgefäße auskleiden, charakterisiert (3; 104). Mittels Warthin-Starry Silberfärbung wurde gezeigt, dass die Bakterien eng mit den proliferierenden Endothelzellen assoziiert sind (158).

#### **4.1. Die Rolle von Makrophagen**

Makrophagen sind professionelle Phagozyten, die ständig aus im Blut zirkulierenden Monozyten heranreifen. Sie verlassen den Blutkreislauf und wandern ins Gewebe ein, wo sie ihre Funktion der „angeborenen Immunität“ erfüllen (80).

##### **4.1.1. Makrophagen und Angiogenese**

Makrophagen spielen in der Angiogenese eine wichtige Rolle, was vor allem bei der Vaskularisation von Tumoren gut untersucht ist. Sie sind in der Lage, eine Anzahl von angiogenetischen Zytokinen zu produzieren wie z.B. VEGF, *basic fibroblast growth faktor* (bFGF), Interleukin 8 (IL-8), Interleukin 1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (74; 93; 109). Diese Zytokine regen Endothelzellen zur Migration und zum Wachstum an und fördern somit die Angiogenese, außerdem verändern sie die lokale extrazelluläre Matrix durch Matrix-Metalloproteinasen (65). Für das Maligne Melanom beispielsweise wurde gezeigt, dass eine Korrelation zwischen der Anzahl der Makrophagen, die das Gewebe infiltrieren, und der Dichte der Kapillaren besteht (130).

##### **4.1.2. Makrophagen und bakterielle Infektionen**

Makrophagen erkennen Bakterien mittels Oberflächenrezeptoren (z.B. CD14, CR3) und nehmen die Bakterien über Phagozytose auf (80). Die Phagosomen verschmelzen mit Lysosomen zu Phagolysosomen, in denen die Bakterien abgetötet und abgebaut werden. Bei der Phagozytose erzeugen Makrophagen eine Reihe von toxischen Produkten, die beim Abtöten des aufgenommenen Mikroorganismus mitwirken. Die wichtigsten Produkte sind Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das Superoxidanion ( $O_2^-$ ) und Stickstoffoxid (NO) (14; 45). Durch den Kontakt mit Bakterien werden Makrophagen aktiviert, woraufhin sie die oben genannten Zytokine sezernieren. Diese locken aus dem Blut z.B. Neutrophile und Monozyten an. In der Folge kommt es zur lokalen Entzündung, die sich durch Rötung, Schwellung, Schmerz, Überwärmung und Funktionseinschränkung auszeichnet (4; 80).

Allerdings gibt es Bakterien, die Verteidigungsstrategien gegen die Abtötung durch Makrophagen besitzen. *Escherichia coli* z.B. exprimiert bei Kontakt zu NO vermehrt Superoxiddismutase und DNA-Reparaturenzyme, um sich vor dem oxidativen Schaden zu schützen (127). Mykobakterien verhindern die Reifung des Phagosoms und die

Fusion mit Lysosomen (41; 75). *Salmonella typhimurium* ist ein Erreger, der in Makrophagen replizieren kann und in Lysosomen überlebt, wahrscheinlich durch eine Verhinderung der Ansäuerung des Kompartiments (129).

Auch im Krankheitsbild der BA werden die Läsionen von Monozyten und Makrophagen infiltriert (104; 122), welche Rolle sie dabei spielen, ist allerdings noch nicht geklärt. Da jedoch gezeigt wurde, dass Makrophagen, die mit *B. henselae* infiziert sind, VEGF und IL-1 $\beta$  sezernieren (142), kann man annehmen, dass infizierte Makrophagen einen Teil zur Entstehung der Gefäßproliferationen beitragen.

#### **4.2. Inhibition der Apoptose: Eine Pathogenitätsstrategie von *B. henselae*?**

Auch bei den Lymphknotenveränderungen, die sich bei der Katzenkratzkrankheit zeigen, spielen Makrophagen eine wichtige Rolle. Die veränderten Lymphknoten bestehen aus einem zentralen Abszess, der von einem inneren Ring von Makrophagen und einem äußeren Ring von Lymphozyten und Makrophagen umgeben ist. Die Makrophagen des inneren Ringes werden im Verlauf der Krankheit apoptotisch (166). Schweyer und Fayyazi stellten daraufhin zwei mögliche Hypothesen auf: Erstens, dass *B. henselae* Apoptose in Makrophagen aktivieren könnte, um so die Phagozyten, die dem Bakterium gefährlich werden könnten, zu eliminieren, ähnlich wie es für *Shigella* spp. und *Salmonella* spp. beschrieben wurde (121; 209). Zweitens, dass die Apoptose von Makrophagen als Abwehrmechanismus gegen *B. henselae* zu verstehen ist, wie es für die mykobakterielle Infektion gezeigt wurde (120).

Die Apoptose von Endothelzellen wird durch eine Infektion mit *B. henselae* inhibiert (92; 156). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass *Bartonella quintana* die Apoptose von Endothelzellen zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion induziert, während sie später gehemmt wird (106). Die Zusammenfassung dieser Fakten lässt erkennen, dass die Datenlage bezüglich *Bartonella*-Infektion und Wirtszellapoptose bislang kontrovers ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass *B. henselae* in der Lage ist, die durch PDTC induzierte Apoptose von Mono Mac 6-Zellen dosisabhängig zu inhibieren (s. 3.1. bis 3.3.). Außerdem konnte die Apoptoseinhibition ebenfalls in J774- und in HeLa-Zellen sowie bei einer Induktion der Apoptose durch Mitomycin C, Etoposid und Staurosporin nachgewiesen werden (s. 3.4., 3.5. und 3.8.).

Die verwendeten Apoptoseinduktoren vermitteln die Apoptose über verschiedene Wege. PDTC reagiert mit reaktiven Sauerstoffmetaboliten, die für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B benötigt werden (159). Außerdem führt es über eine Freisetzung von Cytochrom c zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade (44). Etoposid und Mitomycin C sind Zytostatika, die Zellen über verschiedene Mechanismen töten können. Schon länger ist die Tatsache bekannt, dass sie in DNA interkalieren, die Replikation der DNA inhibieren, die Zellmembran beschädigen und freie Radikale erzeugen (15; 73). Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass diese Zytostatika auch in der Lage sind, über direkte Aktivierung der Caspasen 3, 6, 7 und 8 Apoptose auszulösen (194). Staurosporin stellt einen sehr schnellen und potenten Apoptoseinduktor dar, der genaue Weg der Apoptoseauslösung ist allerdings noch unklar. Bekannt ist, dass Staurosporin einen unselektiven Inhibitor von verschiedenen Kinasen darstellt (118; 153), außerdem ist bei der Induktion von Apoptose durch Staurosporin eine mitochondriale Caspasen-Aktivierung beteiligt (20; 177).

Was könnte der biologische Sinn der Inhibition von Apoptose durch *B. henselae* sein? *B. henselae* als fakultativ intrazelluläres Pathogen (9) würde sein Habitat verlieren, wenn die Wirtszellen apoptotisch werden, da sich die Bakterien intrazellulär besser replizieren und dort lange persistieren (89). Weiterhin kann man annehmen, dass *B. henselae* intrazellulär vor Angriffen des Immunsystems geschützt ist. Bei Freisetzung aus apoptotischen Zellen wäre das Bakterium potenten Abwehrzellen wie Neutrophilen bzw. dem humoralen Immunsystem ausgesetzt (125). Es könnte auch möglich sein, dass sich eine *B. henselae*-Infektion über infizierte Makrophagen im Organismus ausbreitet, womit es ebenfalls sinnvoll wäre, die Apoptose dieses „Vehikels“ zu unterbinden. Eine ähnliche Disseminierung über Makrophagen im Organismus wurde für *Yersinia enterocolitica* gezeigt (12), allerdings induziert dieses Bakterium Apoptose in Makrophagen (150).

Für andere intrazellulär lebende Bakterien wurde schon gezeigt, dass sie die Apoptose ihrer Wirtszellen inhibieren und so einen Überlebensvorteil haben. Chlamydien, die nur zu einem Leben in eukaryoten Zellen fähig sind, da sie auf den Energiestoffwechsel der Wirtszelle angewiesen sind, inhibieren die Apoptose von Endothelzellen und Makrophagen (6; 59). *Mycobacterium* spp. und *Brucella* spp. inhibieren die spontan



aufretende Apoptose von Monozyten (54; 71; 101). *Rickettsia rickettsii*, das als obligat intrazelluläres Pathogen auf die Zufuhr von Wirtszell-produziertem ATP als Energielieferant angewiesen ist, verhindert die Apoptose von Endothelzellen (33). Die Inhibition der Wirtszellapoptose ist also bei intrazellulär lebenden Bakterien, insbesondere  $\alpha$ 2-Proteobakterien, ein weitverbreiteter Mechanismus, der als Sicherstellung des eigenen Habitats verstanden werden kann.

### **4.3. Mechanismen der Apoptoseinhibition durch *B. henselae***

#### **4.3.1. Charakterisierung der apoptoseinhibierenden Faktoren von *B. henselae***

Von großem Interesse ist die Frage nach den bakteriellen Faktoren, die an der Apoptoseinhibition beteiligt sind. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob nur viable Bakterien eine Apoptoseinhibition zeigen oder ob auch abgetötete Erreger diese Effekte auslösen können. Es zeigte sich, dass Bartonellen, die vor Infektion mit Gentamicin inkubiert werden, noch im selben Maße wie viable Bartonellen zur Inhibition der Apoptose fähig sind (s. 3.12.2.). Es scheint also, dass ein intakter Proteinsyntheseapparat, der bei mit Gentamicin behandelten *B. henselae* nicht mehr vorliegt, für die Inhibition der Apoptose nicht notwendig ist. Es kann damit postuliert werden, dass keine sezernierten Proteine, sondern möglicherweise präformierte Proteine wie z.B. Oberflächenproteine verantwortlich sind für die Verhinderung der Apoptose, ähnlich wie es für die Induktion von VEGF gezeigt wurde (87). Passend dazu könnte man annehmen, dass diese Oberflächenproteine durch Hitzebehandlung zumindest teilweise denaturiert wurden und deswegen hitzegetötete *B. henselae* nur eine verminderte Fähigkeit zur Apoptoseinhibition zeigen (s. 3.12.1.). Die Daten weisen zudem darauf hin, dass es sich bei dem apoptoseinhibierenden Faktor möglicherweise nicht um das gleiche Oberflächenprotein handelt, das bei einer *B. henselae*-Infektion für die Hochregulation von Intrazellulärem Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) verantwortlich ist, da dieses Oberflächenprotein hitzebeständig ist (111).

Es wurde postuliert, dass der apoptoseinhibierende Faktor bei einer *B. henselae*-Infektion von Endothelzellen ein löslicher Faktor ist (92), allerdings wurde nicht ausgeschlossen, ob es sich dabei um VEGF handelt. Im Gegensatz dazu konnte für die

Infektion von Mono Mac 6-Zellen ausgeschlossen werden, dass die Apoptoseinhibition durch VEGF zustande kommt (s. 3.7.). Daraus ergibt sich die Frage, ob direkter Kontakt zwischen *B. henselae* und den Monozyten nötig ist, um eine Inhibition der Apoptose zu erreichen.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung von *B. henselae* zeigen, dass apoptotische Zellen zu einem niedrigeren Prozentsatz infiziert sind als viable (s. 3.6.1.). Daraus lässt sich schließen, dass die Apoptoseinhibition an die Adhäsion bzw. Invasion von *B. henselae* geknüpft ist. Noch deutlicher fallen Infektionsexperimente im Zweikammern-Modell aus (s. 3.6.2.). Diese Daten zeigen, dass bei Verhinderung des direkten Kontaktes zwischen *B. henselae* und den Mono Mac 6-Zellen durch einen Filter im Vergleich zur Positivkontrolle mit PDTC keine Reduktion der Apoptose erkennbar ist. Somit ergibt sich, dass die direkte Interaktion von *B. henselae* und Wirtszelle zur Inhibition der Apoptose in Monozyten notwendig ist. Dieser Effekt scheint damit nicht bzw. nicht nur durch einen löslichen Faktor bedingt zu sein.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass Oberflächenproteine für die Apoptoseinhibition verantwortlich sind, findet sich darin, dass *B. henselae* BadA<sup>-</sup> (Mutante 42, s. 3.12.3.) keine Fähigkeit zur Verminderung der Apoptose besitzt. Daten aus der Arbeitsgruppe zeigen, dass *B. henselae* an der Oberfläche ein ca. 340 kDa großes, nicht-fimbrielles Adhäsionsmolekül (BadA, *Bartonella*-Adhäsion A) exprimiert. BadA ist strukturell und funktionell homolog zum Oberflächenprotein YadA (*Yersinia*-Adhäsion A) von *Y. enterocolitica* (146; 180). Die Expression von BadA, wahrscheinlich identisch mit den sogenannten „Typ IV-Pili“ von *B. henselae*, ist entscheidend für Zelladhärenz, Interaktion mit Fibronectin und Kollagen sowie für die Induktion proangiogenetischer Faktoren (143) und letztlich auch – wie hier gezeigt - für die Inhibition der Apoptose.

Die Erkenntnisse, dass die Apoptoseinhibition nur bei direktem Bakterien-Wirtszell-Kontakt zustande kommt und dass die BadA-negative Mutante keine antiapoptotische Aktivität aufweist, lassen darauf schließen, dass das Oberflächenprotein BadA einen Schlüsselmechanismus bei der Inhibition der Apoptose darstellt. Unklar ist allerdings noch, ob dieser Effekt direkt durch BadA ausgelöst wird oder ob über BadA nur die Adhäsion an die Wirtszelle vermittelt wird und nachfolgend andere Mechanismen für die Inhibition der Apoptose verantwortlich sind.

Derartige Funktionen könnten z.B. auch dem Typ IV-Sekretionssystem von *B. henselae* (131; 157) zukommen. Neueste Daten zeigen, dass dieses Typ IV-Sekretionssystem eine wichtige Rolle in der Inhibition der Apoptose von Endothelzellen spielt (156). Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um die beteiligten bakteriellen Faktoren näher zu untersuchen. Experimente zur Rolle von BadA in der Inhibition der Apoptose werden gerade durchgeführt.

Weitere Untersuchungen sind auch notwendig, um die *B. henselae*-Mutanten zu charakterisieren, die eine veränderte Fähigkeit zur Apoptoseinhibition zeigen. Da die Tn903-inserierten Gene der Mutanten 188, 226, 227 und 232 nicht mit dem *badA*-Gen übereinstimmen, kann man annehmen, dass mehrere Faktoren von *B. henselae* an der Inhibition der Apoptose beteiligt sind. Schwer zu erklären bleibt das Phänomen, dass einige Mutanten eine verstärkte Fähigkeit zur Apoptoseinhibition zeigen. Vorstellbar wäre, dass z.B. das jeweilige Genprodukt, das durch die Insertion des Transposons nicht mehr exprimiert wird, normalerweise die Fähigkeit zur Apoptoseinhibition abschwächt, oder dass kompensatorisch anstelle des ausgefallenen Proteins mehr von dem Protein gebildet wird, das für die Inhibition der Apoptose verantwortlich ist. Weitere Untersuchungen sind zur Klärung dieser Frage notwendig.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Apoptose nicht spezifisch für *B. henselae* Marseille ist. Auch *B. henselae* Houston-1 und *B. quintana* Toulouse waren in der Lage, die Apoptose von Mono Mac 6-Zellen zu inhibieren. Nicht ganz im Einklang mit den bisher in der Literatur für *B. henselae* beschriebenen Daten zeigten Liberto et al., dass *B. quintana* zu einem frühen Zeitpunkt die Apoptose von Endothelzellen induziert, während sie später gehemmt wird (106). Trotzdem wurde somit eine antiapoptotische Aktivität von *B. quintana* in Endothelzellen gezeigt. In dieser Arbeit konnte diese ebenfalls für Makrophagen nachgewiesen werden. Da die Infektion eines Menschen mit *B. quintana* ebenfalls zum Krankheitsbild der BA führen kann (97), darf spekuliert werden, dass ähnliche Mechanismen wie die für *B. henselae* beschriebenen zur Entstehung der BA durch *B. quintana* führen und deswegen auch auf zellulärer Ebene gleiche Effekte zu erwarten sind.

#### 4.3.2. Zelluläre Mechanismen der Apoptoseinhibition durch *B. henselae*

Zur Apoptoseinduktion wurde in dieser Arbeit Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) benutzt, von dem bekannt ist, dass es in Mono Mac 6-Zellen (204) und anderen Monozytenzelllinien (44; 77; 132) sowie in Makrophagen (56) Apoptose induziert. PDTC wirkt über eine Hemmung von NF- $\kappa$ B (159) sowie über eine Freisetzung von Cytochrom c (44). Ein Modell für die Inhibition der PDTC-induzierten Apoptose wurde bereits früher bei einem *in vitro*-Infektionsmodell mit *Chlamydia pneumoniae* beschrieben (186). PDTC ist zudem ein Stimulus, der etwas langsamer und schwächer wirkt als die meisten Apoptoseinduktoren wie z.B. Staurosporin, somit wird der Nachweis der Apoptoseinhibition durch *B. henselae* erleichtert. Tatsächlich war *B. henselae* in der Lage, die durch PDTC induzierte Apoptose von Mono Mac 6-Zellen vollständig zu inhibieren (s. 3.1.). Ein Nachteil von PDTC ist allerdings, dass der genaue molekulare Weg, über den Apoptose induziert wird, nicht bekannt ist. So kann auch nicht mit Sicherheit gesagt werden, an welcher Stelle *B. henselae* in diesen Weg eingreift.

Als weitere Apoptoseinduktoren wurde Etoposid, Mitomycin C und Staurosporin verwendet. Etoposid und Mitomycin C sind Zytostatika, die über DNA-Interkalation und Caspasenaktivierung Apoptose auslösen (15; 73; 194). Staurosporin inhibiert Kinasen und aktiviert Caspasen (20; 118; 153; 177). Die Tatsache, dass *B. henselae* in der Lage ist, nicht nur die PDTC-induzierte Apoptose, sondern auch die durch Etoposid, Mitomycin C und Staurosporin ausgelöste Apoptose zu inhibieren, zeigt, dass dieser Effekt von *B. henselae* nicht auf einen Induktor beschränkt ist, sondern einen generellen Mechanismus darstellt. Wichtiger Ansatzpunkt der Apoptoseinhibition ist wahrscheinlich Caspase 3. Diese Effektorcaspase, die am Ende der Caspasen-Kaskade steht, wird durch alle verwendeten Induktoren aktiviert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *B. henselae* die Aktivierung von Caspase 3 verhindert (s. 3.11.). Außerdem ist bekannt, dass *cellular inhibitor of apoptosis* 1 und 2 (cIAP-1 und -2), die unter anderem Caspase 3 inhibieren, durch *B. henselae* induziert werden (85). Somit könnte entweder die direkte Inaktivierung von Caspase 3 oder die indirekte über cIAP-1 und -2 in allen verwendeten Systemen eine Rolle spielen.

*B. henselae* induziert vor allem dann eine deutliche Erhöhung der Viabilität von Mono Mac 6-Zellen, wenn die Zellen mit den Bakterien vor Zugabe von Etoposid oder

Mitomycin C 24 h präinkubiert wurden. Zusammen mit den anderen Ergebnissen, die zeigen, dass *B. henselae* in der Lage ist, die Wirtszellapoptose zu verhindern, kann man annehmen, dass *Bartonella* die Zellen nach der Infektion so moduliert, dass sie vor dem (*in vivo* möglicherweise) später eintretenden Ereignis der Apoptose geschützt sind.

Die Inhibition der Apoptose durch *B. henselae* konnte in Mono Mac 6-, J774.A1- sowie HeLa 229-Zellen gezeigt werden. Mono Mac 6-Zellen stellen eine humane Monozytenzelllinie dar (205), J774.A1-Zellen sind murine Makrophagen, während HeLa 229-Zellen eine humane epitheliale Zervix-Karzinom-Zelllinie sind (64). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Apoptose einer Monozyten-, einer Makrophagen- sowie einer epithelialen Zelllinie durch *B. henselae* hemmbar ist, kann man annehmen, dass die Inhibition der Apoptose durch *B. henselae* kein für Endothelzellen (92; 156) und Monozyten spezifischer Effekt ist, sondern vielleicht generalisiert bei allen Wirtszellen auftritt, die durch *B. henselae* infiziert werden.

Ist für die Inhibition der Apoptose direkter Kontakt zwischen *B. henselae* und den Wirtszellen nötig, oder wird die Apoptoseinhibition wie in dem Modell von Kirby und Nekorchuk (92) über einen löslichen Faktor vermittelt?

Um darzustellen, wo *B. henselae* bei der Infektion von Mono Mac 6-Zellen lokalisiert ist, wurden innerhalb der Arbeitsgruppe Adhäsions- bzw. Invasionsassays durchgeführt. Diese ergaben, dass nach 30 min ca. 10 Bakterien pro Zelle adhären und nach 18 h 0,23 Bakterien pro Zellen invadiert sind (85)<sub>2</sub>, was vergleichbar ist mit früher veröffentlichten Zahlen für Endothelzellen (89). Damit stellten sich Mono Mac 6-Zellen als brauchbares Infektionsmodell für *B. henselae*-Infektionen heraus.

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation der Bakterien wurden elektronenmikroskopische Bilder erstellt, in denen sich zeigte, dass die Bakterien intrazellulär in membranumschlossenen Vakuolen vorliegen (s. 3.6.3.) wie schon früher für Makrophagen und Endothelzellen veröffentlicht (89; 124). Diese infizierten Zellen zeigen keine Zeichen der Apoptose (s. Abb. 10). Man könnte postulieren, dass diese Vakuolen Phagolysosomen sind, in denen die Bakterien vorliegen, da bekannt ist, dass viele Bakterien nach Aufnahme durch Makrophagen in ein phagolysosomales Kompartiment wandern. Gegen die Annahme, dass *B. henselae* in diesen Vakuolen getötet wird,

spricht, dass die Morphologie der Bakterien in der Elektronenmikroskopie strukturell intakt aussieht und dass *B. henselae* 24 h nach Infektion anzüchtbar ist, nachdem die Bakterien durch osmotische Lyse wieder aus den Zellen freigesetzt wurden. *B. henselae* inhibiert offensichtlich die Verschmelzung des Phagosoms mit Lysosomen. Die Struktur der membranumhüllten Vakuole ist noch unklar, es konnte jedoch gezeigt werden, dass deren Membran keine endo- bzw. phagolysosomalen Marker aufweist (103). Für *Salmonella* spp. ist bekannt, dass die Ansäuerung der Vakuolen verzögert, die Fusion mit Lysosomen inhibiert und somit das intrazelluläre Überleben gesichert wird (7; 62). Ein ähnlicher Mechanismus könnte eventuell bei *B. henselae* vorliegen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die zeigen, dass die Verminderung der Apoptose von Mono Mac 6-Zellen nur bei direktem Bakterien-Wirtszell-Kontakt zustande kommt, stehen die Ergebnisse von Kirby und Nekorchuk (92), die zeigten, dass der apoptoseinhibierende Faktor bei einer *B. henselae*-Infektion von HUVEC ein löslicher Faktor ist. In ihren Versuchen besaß Überstand von *B. henselae*-infizierten Endothelzellen antiapoptotische Kapazität. Allerdings haben die Autoren experimentell nicht ausgeschlossen, dass dieser Effekt durch VEGF bedingt ist. Schon länger ist bekannt, dass *B. henselae* die Proliferation von Endothelzellen ohne direkten Kontakt anregt (110). Später wurde gezeigt, dass eine Infektion mit *B. henselae* die Synthese von VEGF induziert, welches im Überstand nachweisbar ist und die Proliferation von Endothelzellen steigert (87; 142). Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigen, dass durch eine Infektion mit *B. henselae* auch direkt in Endothelzellen eine Produktion von VEGF induziert wird, allerdings in sehr viel geringerem Ausmaß als in anderen Zellen (84). Bekannt ist zudem, dass VEGF selbst eine antiapoptotische Wirkung hat (116; 173). Somit ist bei dem Modell von Kirby und Nekorchuk (92) nicht auszuschließen, dass es sich bei dem löslichen Faktor, der die Apoptose von Endothelzellen inhibiert, um VEGF handelt.

Basierend auf diesen Überlegungen sollte untersucht werden, ob die Apoptoseinhibition bei Mono Mac 6-Zellen durch VEGF bedingt ist. Wie schon für die humane Monozytenzelllinie THP-1 (142) konnte hier für Mono Mac 6-Zellen gezeigt werden, dass eine Infektion mit *B. henselae* eine VEGF-Sekretion auslöst (siehe 3.7.). So produzieren Zellen, die mit *B. henselae* infiziert werden, signifikant mehr VEGF als

uninfizierte Zellen. Nach Zugabe VEGF-neutralisierender Antikörper zeigte sich im MTS-Assay kein Unterschied im Anstieg der Viabilität. Deshalb kann man annehmen, dass der antiapoptotische Effekt in diesem Modell nicht durch VEGF bedingt ist, sondern durch bislang nicht näher charakterisierte bakterielle Effektormoleküle. Die Beobachtung, dass direkte Zellinteraktion für die Apoptoseinhibition notwendig ist (Immunfluoreszenz, Infektion im Zwei-Kammern-Modell), unterstützt diese Hypothese.

Die molekularen Mechanismen, die in der Wirtszelle nach einer Infektion mit *B. henselae* ablaufen, sind weitgehend unbekannt. Es wurde gezeigt, dass *B. henselae* in Endothelzellen eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B induziert (61). NF- $\kappa$ B spielt eine wichtige Rolle in der Apoptose. Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors schützt Zellen vor Apoptose, während Zellen mit einem niedrigen Level keinen Schutz haben (17; 189). Monozyten und Makrophagen besitzen eine konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivität, die Zellviabilität bedingt (39; 132), was auch für Mono Mac 6-Zellen beschrieben wurde (60). PDTC als Apoptoseinduktor inhibiert in Monozyten vor allem die induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung, es hat keine Auswirkungen auf das konstitutiv aktive NF- $\kappa$ B (bestehend aus p50-Komplexen), welches Monozyten, Makrophagen und auch speziell Mono Mac 6-Zellen exprimieren (204). In dieser Arbeit wurde deswegen die Rolle von NF- $\kappa$ B in der Inhibition der Apoptose durch *B. henselae* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *B. henselae* in der Lage ist, NF- $\kappa$ B auch in der Gegenwart von PDTC zu aktivieren, was den Schluss nahe legt, dass die *B. henselae*-induzierte Apoptoseinhibition über eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B zustande kommt. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung damit, dass die Inhibition der Apoptose durch *Chlamydia pneumoniae* und *Rickettsia rickettsii* von der Aktivierung von NF- $\kappa$ B abhängt (33; 186). Es ist bekannt, dass die Proteine der Familie *inhibitor of apoptosis* (IAP) die Apoptose sehr effektiv unterdrücken. IAPs wurden erstmals bei Bakuloviren als Proteine beschrieben, die das Überleben und die Ausbreitung des Virus begünstigen (40). Die humane IAP-Familie umfasst cIAP-1, cIAP-2, x-linked IAP (XIAP), neuronales IAP (NIAP), Survivin und BRUCE (*BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme*) (46). Es wurde gezeigt, dass XIAP, c-IAP1, c-IAP2 und Survivin an Caspase 3, 7 und 9 binden und sie inaktivieren, allerdings haben sie keinen Einfluss auf Caspase 1, 6, 8

---

und 10 (47; 149; 178). Die Überexpression von Proteinen der IAP-Familie kann Zellen vor Apoptose schützen, wenn unterschiedliche apoptoseinduzierenden Substanzen auf diese einwirken. Dies wurde unter anderem für die Apoptoseinduktion durch Staurosporin und Etoposid gezeigt (126; 149). Die Transkription von IAPs ist NF- $\kappa$ B-vermittelt (32; 174). Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe zeigen, dass die Infektion mit *B. henselae* cIAP-1 und -2 auf mRNA- und Proteinebene induziert (siehe Anhang, Abb. 21). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit aktuellen Publikationen (21; 185), die zeigen, dass cIAP-2 eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Apoptose durch *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia pneumoniae* spielt. Wenn man nun berücksichtigt, dass erstens die Inhibition der Apoptose in *B. henselae*-infizierten Mono Mac 6-Zellen mit einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B einhergeht, zweitens die Infektion durch *B. henselae* in Endothelzellen NF- $\kappa$ B induziert und drittens *B. henselae* die Wirtszellapoptose von Endothelzellen (92; 156) und Mono Mac 6-Zellen inhibiert (möglicherweise durch Inaktivierung von Caspase 3), kann man die Hypothese aufstellen, dass die Induktion von cIAP-1 und -2 via NF- $\kappa$ B verantwortlich für die Inhibition der Wirtszellapoptose durch *B. henselae* ist.

Caspasen spielen eine Schlüsselrolle in der Apoptose, sie verursachen multiple Veränderungen in der Zelle. Besonders Caspase 3 als Effektorcaspase kommt eine wichtige Funktion zu, weswegen ihre Aktivität nach *B. henselae*-Infektion in dieser Arbeit untersucht wurde. Es zeigte sich, dass es durch Behandlung der Mono Mac 6-Zellen mit PDTC zu einer Aktivierung von Caspase 3 kommt, die bei Behandlung mit PDTC und *B. henselae* nicht nachweisbar ist (s. 3.11.). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von Kirby und Nekorchuk (92), die zeigen, dass *B. henselae* in der Lage ist, in Endothelzellen die Aktivierung von Caspase 3 und 8 zu unterdrücken. Allerdings ist noch unklar, an welcher Stelle und mit welchen Mitteln *B. henselae* in die Caspasen-Kaskade eingreift. Zur Klärung dieser Frage sind weiterführende Untersuchungen notwendig.



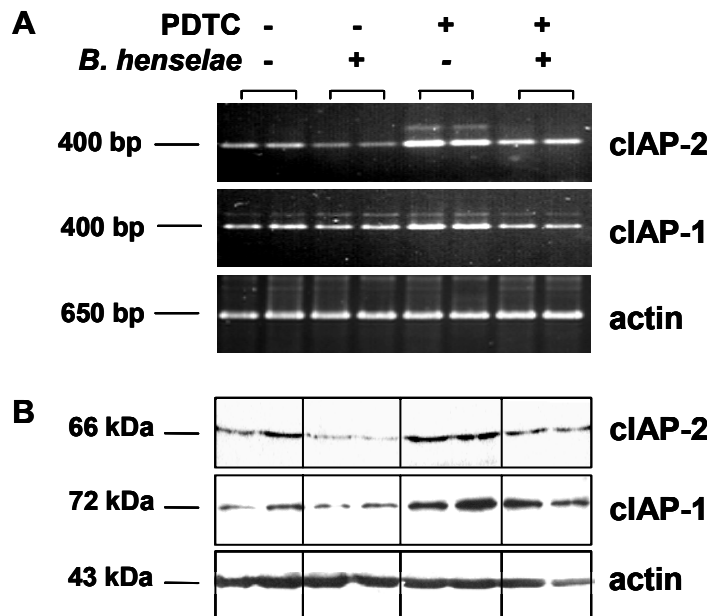


Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse können als Erweiterung des früher für *B. henselae*-Infektionen veröffentlichten VEGF-loop-Modells angesehen werden (88). Dabei kann vermutet werden, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, cIAP-1 und -2 sowie die Unterdrückung von Caspase 3 zu einer Inhibition der Apoptose in *B. henselae*-infizierten Mono Mac 6-Zellen und zu einer verlängerten VEGF-Sekretion führt. Diese VEGF-Sekretion ihrerseits ist möglicherweise verantwortlich für die Induktion der Vaskuloproliferationen, die kennzeichnend für die Krankheitsbilder BA und PH sind (s. Abb. 20). Übereinstimmend mit dieser Hypothese wurde veröffentlicht, dass eine verlängerte und erhöhte VEGF-Produktion von Tumorzellen in Mäusen zu den charakteristischen Merkmalen der BP führt (199).

#### **4.4. Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass *B. henselae* die Apoptose von Mono Mac 6-Zellen inhibiert. An der Inhibition der Apoptose ist höchstwahrscheinlich ein Oberflächenprotein von *B. henselae* (BadA) entscheidend beteiligt. *B. henselae* induziert zwar eine Sekretion von VEGF in Mono Mac 6-Zellen, für die Inhibition der Apoptose spielt sekretiertes VEGF jedoch keine Rolle. Hingegen scheint die Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowie Caspase 3 für die *B. henselae*-vermittelte Apoptose von grundlegender Bedeutung zu sein.

Die Inhibition der Apoptose führt möglicherweise zu einer verlängerten VEGF-Sekretion der *B. henselae*-infizierten Monozyten. Somit könnten die Makrophagen und Monozyten, die die Läsionen der BA und der PH infiltrieren, eventuell über Sekretion von VEGF und anderen Zytokinen ihren Teil zur Entstehung dieser Krankheitsbilder beitragen. Es konnte somit im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition der Wirtszellapoptose durch *B. henselae* möglicherweise ausschlaggebend ist, um die Interaktion zwischen *B. henselae* und ihren Wirtszellen sowie die Pathogenese der durch *B. henselae* ausgelösten Erkrankungen BA und PH modellhaft zu erklären.

**5. Anhang**

**Abb. 21:** Induktion der Transkription und der Expression von cIAP-1 und -2 durch *B. henselae* (MOI 100) in Mono Mac 6-Zellen [Daten entnommen aus (85)]. A. RT-PCR von cIAP-1 und -2 vier Stunden nach Infektion. In der Gegenwart von PDTC (200  $\mu$ M) war die Menge der mRNA von cIAP-1 und -2 reduziert im Vergleich zu uninfizierten Kontrollzellen. Die Infektion durch *B. henselae* führte zum Anstieg von cIAP-1 und -2 im Vergleich zu PDTC-behandelten Zellen. Aktin wurde als interne Kontrolle mitgeführt. B. Expression von cIAP-1 und -2, nachgewiesen im Immunoblot. Die Zelllysate wurden sechs Stunden nach Infektion hergestellt. Die Infektion durch *B. henselae* führte zu erhöhter Expression von cIAP-1 und -2 im Vergleich zu PDTC-behandelten Zellen. Aktin wurde als interne Kontrolle mitgeführt.

## **6. Zusammenfassung**

*B. henselae* inhibiert die Apoptose von Endothelzellen, zudem bewirkt eine *B. henselae*-Infektion die Sekretion von VEGF in verschiedenen Wirtszellen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass eine Infektion mit *B. henselae* zur Inhibition der Apoptose von Mono Mac 6-Zellen führt. Die zugrundeliegenden Pathogenitätsmechanismen auf Bakterien- und Wirtszellseite wurden dabei näher charakterisiert.

Die vorliegende Arbeit lieferte folgende Ergebnisse:

1. Die Infektion von Mono Mac 6-Zellen durch *B. henselae* führt dosisabhängig zu einer Inhibition der PDTC-, Etoposid- und Mitomycin C-induzierten Apoptose.
2. Die Infektion von J774.A1- bzw. HeLa 229-Zellen durch *B. henselae* führt zu einer Inhibition der PDTC- bzw. Staurosporin-induzierten Apoptose.
3. Die Inhibition der Apoptose ist kein Stamm-spezifisches Merkmal von *B. henselae* Marseille, sondern ist auch bei einer Infektion mit *B. henselae* Houston-1 und *B. quintana* Toulouse nachweisbar.
4. Die Infektion durch *B. henselae* induziert eine Produktion von VEGF in Mono Mac 6-Zellen, die ihrerseits nicht verantwortlich ist für die Inhibition der Apoptose durch *B. henselae*.
5. Auf zellulärer Ebene ist eine Aktivierung von NK- $\kappa$ B sowie eine Unterdrückung von Caspase 3 am Prozess der *B. henselae*-vermittelten Apoptoseinhibition beteiligt.
6. Direkter Kontakt zwischen *B. henselae* und der Wirtszelle ist nötig für die Inhibition der Apoptose, jedoch muss keine Viabilität der Bakterien vorliegen.
7. Das Oberflächenprotein BadA ist bei der Inhibition der Apoptose durch *B. henselae* von entscheidender Bedeutung.
8. Experimente mit TN903-Transposon-Mutanten von *B. henselae* ergaben, dass weiteren Genen in der Inhibition der Apoptose durch *B. henselae* eine wichtige Bedeutung zukommt.

Das in dieser Arbeit nachgewiesene Modell der durch *B. henselae* induzierten Apoptoseinhibition von Monozyten beschreibt einen neuen Aspekt in der Pathogenese der BA und PH. Durch die Untersuchung der beteiligten bakteriellen Faktoren und zellulären Abläufe konnte näher beschrieben werden, wie und wodurch die Inhibition der Apoptose in monozytischen Zellen zustande kommt. Die Apoptoseinhibition könnte eine verlängerte VEGF-Sekretion der infizierten Monozyten bedingen, die möglicherweise zur Entstehung der vaskuloproliferativen Krankheitsbilder BA und PH beiträgt. Die gewonnenen Ergebnisse vertiefen das Verständnis über die Interaktion zwischen *B. henselae* und ihren Wirtszellen sowie über die Pathogenese der BA und der PH.

**7. Abkürzungen**

A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BA	Bazilläre Angiomatose
BadA	<i>Bartonella-Adhäsion A</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
<i>B. henselae</i>	<i>Bartonella henselae</i>
<i>B. h.</i>	<i>Bartonella henselae</i>
BRUCE	<i>BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme</i>
BSA	Rinderserumalbumin
PH	Peliosis hepatis
bp	Basenpaare
C	Celsius
Ca	Kalzium
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis</i>
Cl	Chlorid
CSD	<i>cat scratch disease</i>
cpm	<i>counts per minute</i> (Impulse pro Minute)
d	Tag
d.h.	das heißt
DIABLO	<i>direct IAP-binding protein with low pI</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E	Einheiten
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure

## 7. Abkürzungen

---

ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
H	Wasserstoff
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor-1</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
ICAD	<i>inhibitor of caspase-activated DNase</i>
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
Ipa	<i>invasion protein antigen</i>
kDa	kilo-Dalton
KKK	Katzenkratzkrankheit
Mg	Magnesium
min	Minute
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
Na	Natrium
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
OD	optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat

---

PNK	Polynukleotid-Kinase
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	<i>standarddeviation</i> (Standardabweichung)
sec	Sekunde
Sip	<i>Salmonella invasion protein</i>
Smac	<i>second mitochondria derived activator of caspase</i>
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRAIL-R1	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand R1</i>
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	<i>units</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (Vaskulo- endothelialer Wachstumsfaktor)
rhVEGF	rekombinantes humanes VEGF
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
YadA	<i>Yersinia</i> -Adhäsion A
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem



**8. Literatur**

1. Abbasi, S. and Chesney, P.J. (1995): Pulmonary manifestations of cat-scratch disease; a case report and review of the literature. *Pediatr.Infect.Dis.J.*, 14:547-548.
2. Abbott, R.C., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K.A., Kikuchi, Y., Koehler, J.E., and Pedersen, N.C. (1997): Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp.Immunol.Microbiol.Infect. Dis*, 20:41-51.
3. Adal, K.A., Cockerell, C.J., and Petri-WA, J. (1994): Cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and other infections due to *Rochalimaea*. *N.Engl.J. Med.*, 330:1509-1515.
4. Aderem, A. and Underhill, D.M. (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.*, 17:593-623.
5. Aepfelbacher, M., Zumbihl, R., Ruckdeschel, K., Jacobi, C.A., Barz, C., and Heesemann, J. (1999): The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defense. *Biol.Chem.*, 380:795-802.
6. Airene, S., Surcel, H.M., Tuukkanen, J., Leinonen, M., and Saikku, P. (2002): *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scand.J.Immunol.*, 55:390-398.
7. Alpuche Aranda, C.M., Swanson, J.A., Loomis, W.P., and Miller, S.I. (1992): *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89:10079-10083.
8. Anderson, B.E. and Neuman, M.A. (1997): *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin.Microbiol.Rev.*, 10:203-219.
9. Andersson, S.G. and Dehio, C. (2000): *Rickettsia prowazekii* and *Bartonella henselae*: differences in the intracellular life styles revisited. *Int.J.Med. Microbiol.*, 290:135-141.
10. Arends, M.J. and Wyllie, A.H. (1991): Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int.Rev.Exp.Pathol.*, 32:223-254.
11. Aronoff, S.C. (1998): *Advances in Pediatric Infectious Diseases*. Mosby International, London.
12. Autenrieth, I.B., Kempf, V., Sprinz, T., Preger, S., and Schnell, A. (1996): Defence mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines. *Infect Immun*, 64:1357-1368.

13. Baker, S.J. and Reddy, E.P. (1996): Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*, 12:1-9.
14. Barral, A., Barral Netto, M., Yong, E.C., Brownell, C.E., Twardzik, D.R., and Reed, S.G. (1993): Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90:3442-3446.
15. Barry, M.A., Behnke, C.A., and Eastman, A. (1990): Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem.Pharmacol.*, 40:2353-2362.
16. Batterman, H.J., Peek, J.A., Loutit, J.S., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1995): *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect.Immun.*, 63:4553-4556.
17. Beg, A.A. and Baltimore, D. (1996): An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, 274:782-784.
18. Benson, L.A., Kar, S., McLaughlin, G., and Ihler, G.M. (1986): Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect.Immun.*, 54:347-353.
19. Berger, T.G. and Koehler, J.E. (1993): Bacillary angiomatosis. *AIDS Clin. Rev.*, 43-60.
20. Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1994): Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp.Cell Res.*, 211:314-321.
21. Binnicker, M.J., Williams, R.D., and Apicella, M.A. (2003): Infection of human urethral epithelium with *Neisseria gonorrhoeae* elicits an upregulation of host anti-apoptotic factors and protects cells from staurosporine-induced apoptosis. *Cell Microbiol*, 5:549-560.
22. Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72:248-254.
23. 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 *Rickettsiales*. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 43:777-786.
24. Brenner, S.A., 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.

25. Brouqui, P. and Raoult, D. (1996): *Bartonella quintana* invades and multiplies within endothelial cells in vitro and in vivo and forms intracellular blebs. *Res.Microbiol.*, 147:719-731.
26. Burrowes, P. and Goodman, P. (1995): Multiple pulmonary nodules as a manifestation of cat-scratch disease. *Can.Assoc.Radiol.J.*, 46:48-50.
27. Caniza, M.A., Granger, D.L., Wilson, K.H., Washington, M.K., Kordick, D.L., Frush, D.P., and Blichington, R.B. (1995): *Bartonella henselae*: etiology of pulmonary nodules in a patient with depressed cell-mediated immunity. *Clin.Infect.Dis.*, 20:1505-1511.
28. Carithers, H.A. (1985): Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1.200 patients. *Am.J.Dis.Child*, 139:1124-1133.
29. Carithers, H.A. and Margileth, A.M. (1991): Cat-scratch disease. Acute encephalopathy and other neurologic manifestations. *Am.J.Dis.Child*, 145:98-101.
30. Chomel, B.B., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K., Chi, B., Yamamoto, K., Roberts-Wilson, J., Gurfield, A.N., 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. Chu, Z.L., McKinsey, T.A., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M.H., and Ballard, D.W. (1997): Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94:10057-10062.
33. Clifton, D.R., Goss, R.A., Sahni, S.K., van Antwerp, D., Baggs, R.B., Marder, V.J., Silverman, D.J., and Sporn, L.A. (1998): NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95:4646-4651.
34. Cockerell, C.J., Bergstresser, P.R., Myrie-Williams, C., and Tierno, P.M. (1990): Bacillary epithelioid angiomatosis occurring in an immunocompetent individual. *Arch.Dermatol.*, 126:787-790.
35. Cockerell, C.J., Whitlow, M.A., Webster, G.F., and Friedman-Kien, A.E. (1987): Epithelioid angiomatosis: a distinct vascular disorder in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *Lancet*, 2:654-656.
36. Cohen, G.M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem.J.*, 326 ( Pt 1):1-16.

37. Cohen, G.M., Sun, X.M., Fearnhead, H., MacFarlane, M., Brown, D.G., Snowden, R.T., and Dinsdale, D. (1994): Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J.Immunol.*, 153:507-516.
38. 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.
39. Conti, L., Hiscott, J., Papacchini, M., Roulston, A., Wainberg, M.A., Belardelli, F., and Gessani, S. (1997): Induction of relA(p65) and I kappa B alpha subunit expression during differentiation of human peripheral blood monocytes to macrophages. *Cell Growth Differ.*, 8:435-442.
40. Crook, N.E., Clem, R.J., and Miller, L.K. (1993): An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J.Virol.*, 67:2168-2174.
41. de Chastellier, C. and Thilo, L. (1997): Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur.J.Cell Biol.*, 74:49-62.
42. Debré, R.M.L., Jammet, M.-L., Costil, L., and Mozziconacci, P. (1950): La maladie des griffes de chat. *Bull.Soc.Méd.Paris*, 76-79.
43. Dehio, C., Meyer, 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.
44. Della Ragione, F., Cucciolla, V., Borriello, A., Della Pietra, V., Manna, C., Galletti, P., and Zappia, V. (2000): Pyrrolidine dithiocarbamate induces apoptosis by a cytochrome c-dependent mechanism. *Biochem.Biophys.Res. Commun.*, 268:942-946.
45. Demple, B. (1999): Genetic responses against nitric oxide toxicity. *Braz.J. Med.Biol.Res.*, 32:1417-1427.
46. Deveraux, Q.L. and Reed, J.C. (1999): IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 13:239-252.
47. Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997): X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388:300-304.
48. Dias, S., Shmelkov, S.V., Lam, G., and Rafii, S. (2002): VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood*, 99:2532-2540.

49. 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. *Ann.Intern.Med.*, 118:331-336.
50. Dorstyn, L., Read, S.H., Quinn, L.M., Richardson, H., and Kumar, S. (1999): DECAF, a novel *Drosophila* caspase related to mammalian caspase-3 and caspase-7. *J.Biol.Chem.*, 274:30778-30783.
51. 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 [published erratum appears in *Lancet* 1996 Mar 23;347(9004):842]. *Lancet*, 347:441-443.
52. Drancourt, M. and Raoult, D. (1995): Cat-scratch disease and disease caused by *Bartonella (Rochalimaea)*. *Presse Med.*, 24:183-188.
53. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102:33-42.
54. Durrbaum-Landmann, I., Gercken, J., Flad, H.D., and Ernst, M. (1996): Effect of in vitro infection of human monocytes with low numbers of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on monocyte apoptosis. *Infect.Immun.*, 64:5384-5389.
55. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391:43-50.
56. Erl, W., Hansson, G.K., de Martin, R., Draude, G., Weber, K.S., and Weber, C. (1999): Nuclear factor-kappa B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.*, 84:668-677.
57. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992): Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J.Immunol.*, 148:2207-2216.
58. Ferrari, D., Stepczynska, A., Los, M., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (1998): Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J.Exp.Med.*, 188:979-984.
59. Fischer, S.F., Schwarz, C., Vier, J., and Hacker, G. (2001): Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect. Immun.*, 69:7121-7129.

60. Frankenberger, M., Pforte, A., Sternsdorf, T., Passlick, B., Baeuerle, P.A., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1994): Constitutive nuclear NF-kappa B in cells of the monocyte lineage. *Biochem.J.*, 304 ( Pt 1):87-94.
61. Fuhrmann, O., Arvand, M., Gohler, A., Schmid, M., Krull, M., Hippenstiel, S., Seybold, J., Dehio, C., and Suttorp, N. (2001): *Bartonella henselae* induces NF-kappaB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Infect.Immun.*, 69:5088-5097.
62. Garcia-del Portillo, F. and Finlay, B.B. (1995): Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol.*, 129:81-97.
63. Gerber, H.P., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998): Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.*, 273:13313-13316.
64. Gey, G.O., Coffman, W.D., and Kubicek, M.T. (1952): Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res*, 12:264-265.
65. Goetzl, E.J., Banda, M.J., and Leppert, D. (1996): Matrix metalloproteinases in immunity. *J.Immunol.*, 156:1-4.
66. Golden, S.E. (1993): Hepatosplenic cat-scratch disease associated with elevated anti-*Rochalimaea* antibody titers. *Pediatr.Infect.Dis.J.*, 12:868-871.
67. Gradon, J.D. and Stein, D.S. (1993): Association between *Rochalimaea* infection and cat-scratch disease. *Clin.Infect.Dis.*, 17:287-288.
68. Grand, A., Celard, M., el Belghiti, R., Ghabban, W., De Gevigney, G., Dabboura, A., Besnard, C., Ouanes, K., Huret, J.F., and Fichter, P. (2001): Subacute infectious endocarditis due to the agent of cat scratch fever: *Bartonella henselae*. *Arch.Mal Coeur Vaiss.*, 94:157-161.
69. Greub, G. and Raoult, D. (2002): *Bartonella*: new explanations for old diseases. *J.Med.Microbiol.*, 51:915-923.
70. Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 13:1899-1911.
71. Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P., and Dornand, J. (2000): In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect.Immun.*, 68:342-351.
72. Grossmann, M., O'Reilly, L.A., Gugasyan, R., Strasser, A., Adams, J.M., and Gerondakis, S. (2000): The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required

- during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression. *EMBO J.*, 19:6351-6360.
73. Hannun, Y.A. (1997): Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*, 89:1845-1853.
  74. Haraguchi, M., Miyadera, K., Uemura, K., Sumizawa, T., Furukawa, T., Yamada, K., Akiyama, S., and Yamada, Y. (1994): Angiogenic activity of enzymes. *Nature*, 368:198
  75. Hart, P.D., Armstrong, J.A., Brown, C.A., and Draper, P. (1972): Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria. *Infect.Immun.*, 5:803-807.
  76. Heye, ., Matthijs, P., Wallon, J., and van Campenhoudt, M. (2003): Cat-scratch disease osteomyelitis. *Skeletal Radiol.*, 32:49-51.
  77. Hida, A., Kawakami, A., Nakashima, T., Yamasaki, S., Sakai, H., Urayama, S., Ida, H., Nakamura, H., Migita, K., Kawabe, Y., and Eguchi, K. (2000): Nuclear factor-kappaB and caspases co-operatively regulate the activation and apoptosis of human macrophages. *Immunology*, 99:553-560.
  78. Igney, F.H. and Krammer, P.H. (2002): Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat.Rev.Cancer*, 2:277-288.
  79. Jackson, L.A., Perkins, B.A., and Wenger, J.D. (1993): Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am.J.Public Health*, 83:1707-1711.
  80. Janeway, C.A., Travers, P., and Walport, M. (2002): *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
  81. Johnson, G., Ayers, M., McClure, S.C., Richardson, S.E., and Tellier, R. (2003): Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (ribC). *J.Clin.Microbiol.*, 41:1069-1072.
  82. Kayalar, C., Ord, T., Testa, M.P., Zhong, L.T., and Bredesen, D.E. (1996): Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93:2234-2238.
  83. Kemper, C.A., Lombard, C.M., Deresinski, S.C., and Tompkins, L.S. (1990): Visceral bacillary epithelioid angiomas: possible manifestations of disseminated cat scratch disease in the immunocompromised host: a report of two cases. *Am.J.Med.*, 89:216-222.
  84. Kempf, V.A.J. (persönliche Mitteilung), 2002.

85. Kempf, V.A.J., Schairer, A., Neumann, D., Grassl, G.A., Lauber, K., Lebiedziejewski, M., Schaller, M., Kyme, P., Wesselborg, S., and Autenrieth, I.B.: *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. Cell Microbiol., in Druck.
86. Kempf, V.A.J., Petzold, H., and Autenrieth, I.B. (2001): Cat scratch disease due to *Bartonella henselae* infection mimicking parotid malignancy. Eur.J Clin.Microbiol Infect.Dis., 20:732-733.
87. 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., 3:623-632.
88. Kempf, V.A.J., Hitziger, N, Riess, T, and Autenrieth, I.B.A (2002): Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? Trends Microbiol. 10:269-275.
89. Kempf, V.A.J., Schaller, M., Behrendt, S., Volkmann, B., Aepfelbacher, M., Cakman, I., and Autenrieth, I. (2000): Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. Cellular Microbiology, 2:431-441.
90. Kempf, V.A.J., Lebiedziejewski, M., Alitalo, K., Wälzlein, J.H., Eehalt, U., Fiebig, J., Schütt, B., Sander, C., Müller, S., Grassl, G., Brem, B., and Autenrieth, I.B.: Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of HIF-1 in bacterial infections. (zur Publikation eingereicht).
91. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br.J.Cancer, 26:239-257.
92. 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
93. Koch, A.E., Poverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elner, V.M., Elner, S.G., and Strieter, R.M. (1992): Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. Science, 258:1798-1801.
94. 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.
95. 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. Ann.Intern.Med., 109:449-455.



96. 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.
97. Koehler, J.E., Sanchez, .A., Garrido, C.S., Whitfeld, M.J., Chen, F.M., Berger, T.G., Rodriguez-Barradas, M.C., LeBoit, P.E., and Tappero, J.W. (1997): Molecular epidemiology of *bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N.Engl.J.Med.*, 337:1876-1883.
98. Koehler, J.E. and Tappero, J.W. (1993): Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin.Infect. Dis.*, 17:612-624.
99. Kordick, D.L. and Breitschwerdt, E.B. (1995): Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *J.Clin.Microbiol.*, 33:1655-1656.
100. Kosoy, M., Murray, M., Gilmore, R.D. Jr., Bai, Y., and Gage, K.L. (2003): *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *J.Clin.Microbiol.*, 41:645-650.
101. Kremer, L., Estaquier, J., Brandt, E., Ameisen, J.C., and Locht, C. (1997): *Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin* infection prevents apoptosis of resting human monocytes. *Eur.J.Immunol.*, 27:2450-2456.
102. Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J.L., and Mignotte, B. (1995): The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.*, 9:1277-1287.
103. Kyme, P., Haas, A., Schaller, M., and Kempf, V.A.J.: *B. henselae* avoids trafficking to a lysosomal compartment in macrophages and endothelial cells. (Publikation in Vorbereitung)
104. LeBoit, P.E., Berger, T.G., Egbert, B.M., Beckstead, J.H., Yen, T.S., 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.*, 13:909-920.
105. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91:479-489.
106. Liberto, M.C., Matera, G., Lamberti, A.G., Barreca, G.S., Quirino, A., and Foca, A. (2003): In vitro *Bartonella quintana* infection modulates the programmed cell death and inflammatory reaction of endothelial cells. *Diagn.Microbiol Infect.Dis.*, 45:107-115.
107. Lopes, U.G., Erhardt, P., Yao, R., and Cooper, G.M. (1997): p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J.Biol.Chem.*, 272:12893-12896.

108. Lucey, D., Dolan, M.J., Moss, C.W., Garcia, M., Hollis, D.G., Wegner, S., Morgan, G., Almeida, R., Leong, D., Greisen, K.S., and . (1992): Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. *Clin.Infect.Dis.*, 14:683-688.
109. Madtes, D.K., Raines, E.W., Sakariassen, K.S., Assoian, R.K., Sporn, M.B., Bell, G.I., and Ross, R. (1988): Induction of transforming growth factor-alpha in activated human alveolar macrophages. *Cell*, 53:285-293.
110. Maeno, N., Oda, H., Yoshiie, K., Wahid, M.R., Fujimura, T., and Matayoshi, S. (1999): Live *Bartonella henselae* enhances endothelial cell proliferation without direct contact. *Microb.Pathog.*, 27:419-427.
111. Maeno, N., Yoshiie, K., Matayoshi, S., Fujimura, T., Mao, S., Wahid, M.R., and Oda, H. (2002): A heat-stable component of *Bartonella henselae* upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression on vascular endothelial cells. *Scand.J.Immunol.*, 55:366-372.
112. Magnani, M., Crinelli, R., Bianchi, M., and Antonelli, A. (2000): The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-kB). *Curr.Drug Targets.*, 1:387-399.
113. Manders, S.M. (1996): Bacillary angiomatosis. *Clin.Dermatol.*, 14:295-299.
114. Mansueto, P., Di Lorenzo, G., Rizzo, M., Mazzola, G., Affronti, M., Battista, R.G., and Mansueto, S. (2003): Bartonellosis. *Recenti Prog.Med.*, 94:177-185.
115. Margileth, A.M. (1993): Cat scratch disease. *Adv.Pediatr.Infect.Dis.*, 8:1-21.
116. Marx, P.T., Mulder, A.B., Van Den Bergh, F.A., Overbeeke, R., Haanen, C., and Vermes, I. (1999): Apoptosis inducers endotoxin and Fas-ligation enhance the expression of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Endothelium*, 6:335-340.
117. Maurin, M., Birtles, R., and Raoult, D. (1997): Current knowledge of *Bartonella* species. *Eur.J.Clin.Microbiol Infect.Dis.*, 16:487-506.
118. Meggio, F., Donella, D.A., Ruzzene, M., Brunati, A.M., Cesaro, L., Guerra, B., Meyer, T., Mett, H., Fabbro, D., and Furet, P. (1995): Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur.J.Biochem.*, 234:317-322.
119. Mignotte, B. and Vayssiere, J.L. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Eur.J.Biochem.*, 252:1-15.

120. Molloy, A., Laochumroonvorapong, P., and Kaplan, G. (1994): Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J.Exp.Med.*, 180:1499-1509.
121. Monack, D.M., Raupach, B., Hromockyj, A.E., and Falkow, S. (1996): *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93:9833-9838.
122. 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.
123. Munshi, N., Fernandis, A.Z., Cherla, R.P., Park, I.W., and Ganju, R.K. (2002): Lipopolysaccharide-induced apoptosis of endothelial cells and its inhibition by vascular endothelial growth factor. *J Immunol.*, 168:5860-5866.
124. Musso, T., Badolato, R., Ravarino, D., Stornello, S., Panzanelli, P., Merlino, C., Savoia, D., Cavallo, R., Ponzi, A.N., and Zucca, M. (2001): Interaction of *Bartonella henselae* with the murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response. *Infect.Immun.*, 69:5974-5980.
125. Navarre, W.W. and Zychlinsky, A. (2000): Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol.*, 2:265-273.
126. Nogal, M.L., Gonzalez, D.B., Rodriguez, C., Cubelos, B., Carrascosa, A.L., Salas, M.L., and Revilla, Y. (2001): African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *J.Virol.*, 75:2535-2543.
127. Nunoshiba, T., DeRojas-Walker, T., Tannenbaum, S.R., and Demple, B. (1995): Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated murine macrophages. *Infect.Immun.*, 63:794-798.
128. 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 relationships with the alpha-2 subgroup of the class Proteobacteria. *J.Clin.Microbiol.*, 29:2144-2150.
129. Oh, Y.K., Alpuche-Aranda, C., Berthiaume, E., Jinks, T., Miller, S.I., and Swanson, J.A. (1996): Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infect.Immun.*, 64:3877-3883.
130. Ono, M., Torisu, H., Fukushi, J., Nishie, A., and Kuwano, M. (1999): Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 43 Suppl:S69-S71

131. Padmalayam, I., Karem, K., Baumstark, B., and Massung, R. (2000): The gene encoding the 17-kDa antigen of *Bartonella henselae* is located within a cluster of genes homologous to the virB virulence operon. *DNA Cell Biol.* 19:377-382.
132. Pagliari, L.J., Perlman, H., Liu, H., and Pope, R.M. (2000): Macrophages require constitutive NF-kappaB activation to maintain A1 expression and mitochondrial homeostasis. *Mol.Cell Biol.*, 20:8855-8865.
133. Perkins, B.A., Swaminathan, B., Jackson, L.A., Brenner, D.J., Wenger, J.D., Regnery, R.L., and Wear, D.J. (1992): Case 22-1992--pathogenesis of cat scratch disease. *N.Engl.J.Med.*, 327:1599-1601.
134. Peter, M.E., Heufelder, A.E., and Hengartner, M.O. (1997): Advances in apoptosis research. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94:12736-12737.
135. 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.
136. Rathmell, J.C. and Thompson, C.B. (1999): The central effectors of cell death in the immune system. *Annu.Rev.Immunol.*, 17:781-828.
137. Reed, J.A., Brigati, D.J., Flynn, S.D., McNutt, N.S., Min, K.W., Welch, D.F., and Slater, L.N. (1992): Immunocytochemical identification of *Rochalimaea henselae* in bacillary (epithelioid) angiomatosis, parenchymal bacillary peliosis, and persistent fever with bacteremia. *Am.J.Surg.Pathol.*, 16:650-657.
138. Regnery, R. and Tappero, J. (1995): Unraveling mysteries associated with cat-scratch disease, bacillary angiomatosis, and related syndromes. *Emerg.Infect. Dis.*, 1:16-21.
139. Regnery, R.L., Anderson, B.E., Clarridge, J.E., Rodriguez, B.M., Jones, D.C., and Carr, J.H. (1992): Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin.Microbiol.*, 30:265-274.
140. Regnery, R.L., Childs, J.E., and Koehler, J.E. (1995): Infections associated with *Bartonella* species in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin.Infect.Dis.*, 21 Suppl 1:S94-S98
141. 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.
142. Resto-Ruiz, S., Schmiederer, M., Sweger, D., Newton, C., Klein, T.W., Friedman, H., and Anderson, B.E. Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human

- microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* Infection. *Inf.Immun.* 70(8). 2002.
143. Riess, T., Andersson, S., Schaller, M., Lupas, A., Martin, J., Nordheim, A., Autenrieth, I.B., and Kempf, V.A.J.: *Bartonella henselae* adhesin A is a multifunctional surface protein with an angiogenic capacity. (zur Publikation eingereicht)
  144. Riess, T., Anderson, B., Fackelmayer, A., Autenrieth, I.B., and Kempf, V.A.J. (2003): Rapid and efficient transposon mutagenesis of *Bartonella henselae* by transposome technology. *Gene*, 313:103-109.
  145. Rodriguez, J. and Lazebnik, Y. (1999): Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.*, 13:3179-3184.
  146. Roggenkamp, A., Neuberger, H.R., Flugel, A., Schmoll, T., and Heesemann, J. (1995): Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol.Microbiol.*, 16:1207-1219.
  147. Rolain, J.M., Foucault, C., Guieu, R., La Scola, B., Brouqui, P., and Raoult, D. (2002): *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *Lancet*, 360:226-228.
  148. Rolain, J.M., La Scola, B., Liang, Z., Davoust, B., and Raoult, D. (2001): Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *J.Clin.Microbiol.*, 39:2978-2980.
  149. Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997): The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.*, 16:6914-6925.
  150. Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbihl, R., Kohler, S., Heesemann, J., and Rouot, B. (1998): *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J.Exp.Med.*, 187:1069-1079.
  151. Rudel, T. and Bokoch, G.M. (1997): Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science*, 276:1571-1574.
  152. Rudikoff, D., Phelps, R.G., Gordon, R.E., and Battone, E.J. (1989): Acquired immunodeficiency syndrome-related bacillary vascular proliferation (epithelioid angiomatosis): rapid response to erythromycin therapy. *Arch.Dermatol.*, 125:706-707.

153. Ruegg, U.T. and Burgess, G.M. (1989): Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol.Sci.*, 10:218-220.
154. Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998): Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391:96-99.
155. Sanogo, Y.O., Zeaiter, Z., Caruso, G., Merola, F., Shpynov, S., Brouqui, P., and Raoult, D. (2003): *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg.Infect.Dis.*, 9:329-332.
156. Schmid, M.C., Schulein, R., Dehio, M., Denecker, G., Carena, I., and Dehio, C. (2004): The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol Microbiol*, 52:81-92.
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, G.A., Bergs, C., Reiterer, L., Dissmann, T., Zeitz, M., and Riecken, E.O. (1993): Bacillary angiomatosis in a German patient with AIDS. *Clin.Investig.*, 72:50-54.
159. Schreck, R., Meier, B., Mannel, D.N., Droge, W., and Baeuerle, P.A. (1992): Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J.Exp.Med.*, 175:1181-1194.
160. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., and Schaffner, W. (1989): Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.*, 17:6419
161. Schulein, R. and Dehio, C. (2002): The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol.Microbiol*, 46:1053-1067.
162. Schulein, R., Seubert, A., Gille, C., Lanz, C., Hansmann, Y., Piemont, Y., and Dehio, C. (2001): Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J.Exp.Med.*, 193:1077-1086.
163. Schultze, M. and Kondorosi, A. (1998): Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu.Rev.Genet.*, 32:33-57.
164. Schwartzman, W.A. (1992): Infections due to *Rochalimaea*: the expanding clinical spectrum. *Clin.Infect.Dis.*, 15:893-900.

165. Schwartzman, W.A., Patnaik, M., Barka, N.E., and Peter, J.B. (1994): *Rochalimaea* antibodies in HIV-associated neurologic disease. *Neurology*, 44:1312-1316.
166. Schweyer, S. and Fayyazi, A. (2002): Activation and apoptosis of macrophages in cat scratch disease. *J.Pathol.*, 198:534-540.
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. Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., and Martin, S.J. (1999): Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J.Cell Biol.*, 144:281-292.
169. Smith, E.F. and Townsend, C.O. (1907): A plant tumor of bacterial origin. *Science*, 25:671-673.
170. Spach, D.H., Kanter, A.S., Daniels, N.A., Nowowiejski, D.J., Larson, A.M., Schmidt, R.A., Swaminathan, B., and Brenner, D.J. (1995): *Bartonella (Rochalimaea)* species as a cause of apparent "culture-negative" endocarditis. *Clin.Infect.Dis.*, 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., and Root, R.K. (1995): *Bartonella (Rochalimaea) quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N.Engl.J.Med.*, 332:424-428.
172. Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., and Walczak, H. (2000): FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.*, 12:599-609.
173. Spyridopoulos, I., Brogi, E., Kearney, M., Sullivan, A.B., Cetrulo, C., Isner, J.M., and Losordo, D.W. (1997): Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha: balance between growth and death signals. *J Mol.Cell Cardiol.*, 29:1321-1330.
174. Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J.A., Binder, B.R., and Lipp, J. (1998): Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp.Med.*, 188:211-216.
175. Stoler, M.H., Bonfiglio, T.A., Steigbigel, R.T., and Pereira, M. (1983): An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Am.J Clin.Pathol.*, 80:714-718.

176. Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1996): Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J.Exp.Med.*, 184:1331-1341.
177. Takahashi, A., Hirata, H., Yonehara, S., Imai, Y., Lee, K.K., Moyer, R.W., Turner, P.C., Mesner, P.W., Okazaki, T., Sawai, H., Kishi, S., Yamamoto, K., Okuma, M., and Sasada, M. (1997): Affinity labeling displays the stepwise activation of ICE-related proteases by Fas, staurosporine, and CrmA-sensitive caspase-8. *Oncogene*, 14:2741-2752.
178. Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D.A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J.C. (1998): IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.*, 58:5315-5320.
179. Tappero, J.W., Koehler, J.E., Berger, T.G., Cockerell, C.J., Lee, T.H., Busch, M.P., Stites, D.P., Mohle-Boetani, J., Reingold, A.L., and LeBoit, P.E. (1993): Bacillary angiomatosis and bacillary splenitis in immunocompetent adults. *Ann.Intern.Med.*, 118:363-365.
180. Terti, R., Skurnik, M., Vartio, T., and Kuusela, P. (1992): Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect.Immun.*, 60:3021-3024.
181. Thompson, C.B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267:1456-1462.
182. Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., and Nicholson, D.W. (1997): A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J.Biol.Chem.*, 272:17907-17911.
183. Tompkins, L.S. (1994): *Rochalimaea* infections. Are they zoonoses? *JAMA*, 271:553-554.
184. Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000): Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102:43-53.
185. Wahl, C., Maier, S., Marre, R., and Essig, A. (2003): *Chlamydia pneumoniae* induces the expression of inhibitor of apoptosis 2 (c-IAP2) in a human monocytic cell line by an NF-kappaB-dependent pathway. *Int.J.Med. Microbiol.*, 293:377-381.



186. Wahl, C., Oswald, F., Simnacher, U., Weiss, S., Marre, R., and Essig, A. (2001): Survival of *Chlamydia pneumoniae*-infected Mono Mac 6 cells is dependent on NF-kappaB binding activity. *Infect.Immun.*, 69:7039-7045.
187. Waldvogel, K., Regnery, R.L., Anderson, B.E., Caduff, R., Caduff, J., and Nadal, D. (1994): Disseminated cat-scratch disease: detection of *Rochalimaea henselae* in affected tissue. *Eur.J.Pediatr.*, 153:23-27.
188. Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobe, G.C., and Kerr, J.F. (1988): Patterns of cell death. *Methods Achiev.Exp.Pathol.*, 13:18-54.
189. Wang, C.Y., Mayo, M.W., and Baldwin, A.S. Jr. (1996): TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*, 274:784-787.
190. Wear, D.J., Margileth, A.M., Hadfield, T.L., Fischer, G.W., Schlagel, C.J., and King, F.M. (1983): Cat scratch disease: a bacterial infection. *Science*, 221:1403-1405.
191. Webster, G.F., Cockerell, C.J., and Friedman, K.A. (1992): The clinical spectrum of bacillary angiomatosis. *Br.J.Dermatol.*, 126:535-541.
192. Welch, D.F., Hensel, D.M., Pickett, D.A., San Joaquin, V.H., Robinson, A., and Slater, L.N. (1993): Bacteremia due to *Rochalimaea henselae* in a child: practical identification of isolates in the clinical laboratory. *J.Clin.Microbiol.*, 31:2381-2386.
193. 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.
194. Wesselborg, S., Engels, I.H., Rossmann, E., Los, M., and Schulze-Osthoff, K. (1999): Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood*, 93:3053-3063.
195. Whiteside, S.T. and Israel, A. (1997): I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin.Cancer Biol.*, 8:75-82.
196. Widlak, P. (2000): The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim.Pol.*, 47:1037-1044.
197. Winans, S.C. (1992): Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol.Rev.*, 56:12-31.
198. Wojcik, C. (2002): Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J.Cell Mol.Med.*, 6:25-48.

199. 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.*, 98:7481-7486.
200. Wong, M.T., Thornton, D.C., Kennedy, R.C., and Dolan, M.J. (1995): A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea (Bartonella) henselae* from blood and tissue specimens. *J.Clin.Microbiol.*, 33:742-744.
201. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.*, 68:251-306.
202. 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.
203. Yuan, J. and Yankner, B.A. (2000): Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407:802-809.
204. Ziegler-Heitbrock, H.W., Sternsdorf, T., Liese, J., Belohradsky, B., Weber, C., Wedel, A., Schreck, R., Bauerle, P., and Strobel, M. (1993): Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-kappa B mobilization and TNF production in human monocytes. *J Immunol.*, 151:6986-6993.
205. Ziegler-Heitbrock, H.W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., and Riethmuller, G. (1988): Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer*, 41:456-461.
206. Zöfel, P. (1992): Statistik in der Praxis. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
207. Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J., and Gelinas, C. (1999): The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev.*, 13:382-387.
208. Zupan, J.R., Ward, D., and Zambryski, P. (1998): Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Curr.Opin.Microbiol.*, 1:649-655.
209. Zychlinsky, A., Prevost, M.C., and Sansonetti, P.J. (1992): *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, 358:167-169.

**9. Publikationen und Kongressbeiträge****Publikationen, die aus dieser Arbeit hervorgingen:**

***Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells.** Kempf, V.A.J., Schairer, A., Neumann, D., Grassl, G.A., Lauber, K., Lebidziejewski, M., Schaller, M., Kyme, P., Wesselborg, S., Autenrieth, I.B. Cellular Microbiology, in Druck.

**Kongressbeiträge, die aus dieser Arbeit hervorgingen:**

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

## **10. Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Volkhard Kempf für die gute Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine Motivation sowie für die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Prof. Dr. Autenrieth danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die Anregungen sowie sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Wesselborg bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. Schaller danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, Prof. Dr. Wesselborg, Joachim Manns und Kirsten Lauber für die Hilfe bei den Western Blots und sowie Dr. Spyridopoulos für seine Hilfe beim Erlernen des MTS-Assays.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Diana Neumann für ihre Hilfe bei der Durchführung verschiedener Experimente.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern für die vielen hilfreichen Tipps, die Diskussionen, das Korrekturlesen, das „Mediziner-Necken“ sowie für die nette Atmosphäre, die das Arbeiten viel leichter gemacht hat, insbesondere Guntram, Tanja R., Andi, Lydia, Niclas, Yvonne, Oli Bü., Miriam, Sandra, Pierre, Tanja M., Oli Be. und Christian.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da war und mich unterstützt hat. Außerdem danke ich Klaus für sein kritisches biologisches Hinterfragen und sein unverbrüchliches Zu-mir-halten.

## **11. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Annette Schairer  
Geburtsdatum: 16.01.1978  
Geburtsort: Stuttgart  
Eltern: Inge und Gerhard Schairer

### **Schulbildung:**

1984 – 1988 Weilerhau-Grundschule, Filderstadt  
1988 – 1997 Eduard-Spranger-Gymnasium, Filderstadt

### **Studium:**

04/1998 – 11/2004 Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen  
03/2000 Ärztliche Vorprüfung  
03/2001 1. Staatsexamen  
09/2003 2. Staatsexamen  
16.11.2004 3. Staatsexamen

### **Praktisches Jahr:**

10/2003 – 02/2004 Pädiatrie, Kreiskrankenhaus Böblingen  
02/2004 – 04/2004 Innere Medizin, Berner Klinik, Montana, Schweiz  
04/2004 – 05/2004 Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Böblingen  
06/2004 – 09/2004 Chirurgie, Kreiskrankenhaus Böblingen

### **Promotionsarbeit:**

05/2001 – 05/2004 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Thema:  
„Untersuchungen zur Inhibition der Apoptose von Mono Mac 6-  
Zellen durch *Bartonella henselae*“, betreut durch Dr. V.A.J.  
Kempf (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. I.B. Autenrieth)