

BIOMARKER ZUR BEURTEILUNG DER VIRULENZ VON *COXIELLA BURNETII* IN VERSCHIEDENEN WIRTEN

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-
Schiller-Universität Jena**

von Dipl.-Biol. Katharina Sobotta

geboren am 28. September 1986 in Gera

Gutachter:

1.: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Henke, Jena

2.: PD. Dr. rer. nat. Angela Berndt, Jena

3.: Prof. Dr. med. Silke Fischer, Stuttgart

Verteidigung: 03. Mai 2016

Für meine Mutti

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

1	Abkürzungen	1
2	Zusammenfassung	3
3	Einleitung	5
3.1	<i>Coxiella burnetii</i>	5
3.1.1	Bakteriologie	5
3.1.2	Entwicklungszyklus	6
3.1.3	Genom und Stamm-Differenzierung	7
3.1.4	Virulenzfaktoren	8
3.1.5	Epidemiologie.....	10
3.2	Q-Fieber und Coxiellose.....	10
3.3	Biomarker.....	13
3.4	Das Immunsystem des Wirtes.....	14
3.4.1	Makrophagen	14
3.4.2	T-Zell-Klassifizierung und Aktivierung	16
3.4.3	Zytokine und Chemokine.....	17
3.5	Einfluss von <i>C. b.</i> auf die Wirtszelle und die Immunantwort.....	18
3.5.1	Angeborenes Immunsystem.....	18
3.5.2	Adaptive Immunsystem	20
4	Zielstellung	22
5	Material	23
5.1	Organismen.....	23
5.1.1	Zellen	23
5.1.2	<i>C. b.</i> -Stämme	23
5.2	Chemikalien/Medien.....	25
5.3	Oligonukleotide und Primer	26
5.4	Kommerzielle Testsysteme	29
5.5	Antikörper.....	29
5.6	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	30
5.6.1	Puffer, Lösungen und Medien für Zellkulturtechniken.....	30
5.6.2	Lösungen und Puffer für bakteriologische Arbeiten	32
5.6.3	Puffer für molekularbiologische Arbeiten	33
5.6.4	Puffer für immunologische Techniken	33

Inhaltsverzeichnis

6	Methoden	35
6.1	Zellbiologische Methoden.....	35
6.1.1	Zellkultur	35
6.1.2	Präparation von bovinen MDM aus dem Blut.....	35
6.1.3	Generierung humaner MDM-Kulturen	37
6.1.4	Isolierung und Kultivierung von bovinen Alveolarmakrophagen.....	37
6.1.5	Bestimmung der Vitalität	38
6.1.6	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Makrophagenkulturen	38
6.2	Infektionsversuche in Makrophagenkulturen.....	38
6.2.1	Invasion in bovinen MDM	39
6.2.2	Aufzeichnung einer Replikationskinetik	39
6.2.3	Bestimmung der Wirtsantwort während einer Infektion.....	40
6.2.4	Charakterisierung der Oberflächenmarker-Expression.....	40
6.3	Bakteriologische Methoden	41
6.3.1	Anzucht und Aufreinigung von <i>C. b.</i>	41
6.3.2	Gimenez-Färbung	42
6.3.3	Bestimmung der <i>C. b.</i> -Lebendkeimzahl im KID ₅₀ -Test.....	42
6.3.4	Differenzierung des <i>C. b.</i> -Phasentyps	42
6.3.5	Charakterisierung der bakteriellen Morphologie mittels Negativ-Kontrast-Verfahren.....	43
6.4	Molekularbiologische Methoden	43
6.4.1	RNA-Isolierung aus Makrophagenkulturen.....	43
6.4.2	Quantifizierung der mRNA-Expression.....	44
6.4.3	Quantifizierung der <i>C. b.</i> -Genomäquivalente.....	46
6.4.4	Genotypische Charakterisierung der <i>C. b.</i> -Isolate	48
6.5	Immunologische Methoden	51
6.5.1	IL-1 β Sandwich-ELISA	51
6.5.2	Western-Blot für IL-1 β Nachweis.....	52
6.5.3	Durchflusszytometrie.....	52
6.6	Statistische Auswertung	54
7	Ergebnisse	55
7.1	Charakterisierung der primären Makrophagenkulturen.....	55
7.1.1	Kultivierung von Makrophagen	55
7.1.2	Morphologie und Reinheitsgrad der Makrophagenkulturen.....	55

Inhaltsverzeichnis

7.1.3	<i>E. coli</i> LPS-induzierte Immunreaktion in Makrophagenkulturen.....	56
7.1.4	LPS-induzierte Expression von Makrophagen-Aktivierungsmarkern.....	60
7.2	Charakterisierung der <i>C. b.</i> -Stämme	61
7.2.1	Genetische Typisierung der <i>C. b.</i> -Stämme.....	61
7.2.2	LPS-Phasen-Typisierung	63
7.2.3	Quantifizierung der Inokula.....	64
7.3	Infizierbarkeit von bovinen MDM mit <i>C. b.</i>	65
7.3.1	Etablierung eines <i>In vitro</i> -Infektionsmodells mit bovinen MDM	65
7.3.2	Replikationskinetik von Nml in bovinen MDM	67
7.4	Replikation verschiedener <i>C. b.</i> -Stämme in Makrophagenkulturen.....	68
7.4.1	Replikationsverhalten verschiedener <i>C. b.</i> -Stämme in bovinen MDM.....	68
7.4.2	Replikation verschiedener <i>C. b.</i> -Stämme in humanen MDM.....	69
7.4.3	Vergleichende Analysen der Replikation in bovinen und humanen MDM	74
7.4.4	Replikation von <i>C. b.</i> in bovinen Alveolarmakrophagen.....	79
7.5	Reaktion der Makrophagen auf eine Infektion mit <i>C. b.</i> -Stämmen	80
7.5.1	<i>C. b.</i> -bedingte Immunreaktion in bovinen MDM.....	80
7.5.2	<i>C. b.</i> -bedingte Immunreaktion in der frühen Phase der Infektion in bovinen MDM.....	81
7.5.3	Einfluss von <i>C. b.</i> auf die Sezernierung von IL-1 β durch bovine MDM	84
7.5.4	<i>C. b.</i> -bedingte Immunreaktion in der frühen Phase der Infektion von humanen MDM.....	86
7.5.5	Vergleichende Analyse der Wirtsreaktion in bovinen und humanen MDM	87
7.5.6	<i>C. b.</i> -bedingte Immunreaktion in bovinen Alveolarmakrophagen.....	88
7.6	Einfluss verschiedener <i>C. b.</i> -Stämme auf die Expression von Oberflächenmarkern auf Makrophagen	90
7.6.1	Kinetik der Expression von Oberflächenmarkern nach <i>C. b.</i> -Infektion von bovinen MDM	90
7.6.2	Oberflächenmarker-Expression auf bovinen MDM	92
7.6.3	Oberflächenmarker-Expression auf humanen MDM.....	94
7.6.4	Oberflächenmarker-Expression auf bovinen Alveolarmakrophagen	94
8	Diskussion.....	97
8.1	Charakterisierung der primären Makrophagenkulturen.....	97
8.2	Charakterisierung der <i>C. b.</i> -Stämme	100
8.3	Infizierbarkeit der bovinen MDM mit <i>C. b.</i>	102

Inhaltsverzeichnis

8.4	Replikationskinetik von verschiedenen <i>C. b.</i> -Stämmen in MDM	104
8.5	Immunmodulatorische Reaktion der bovinen MDM nach einer Infektion mit <i>C. b.</i>	107
8.6	<i>C. b.</i> -bedingte Immunreaktion der bovinen und humanen MDM	112
8.7	Einfluss verschiedener <i>C. b.</i> -Stämme auf die Expression von Oberflächenmarkern der MDM	114
8.8	Interaktion zwischen <i>C. b.</i> und bovinen Alveolarmakrophagen	115
8.9	Biomarker und Anwendung des <i>In vitro</i> -Modells	118
9	Schlussfolgerung	119
10	Quellenverzeichnis	121
Anhang	140
	Danksagung	143
	Lebenslauf	144
	Veröffentlichungen der Ergebnisse	144
	Tagungen	144
	Publikationen und Abschlussarbeiten	145
	Ehrenwörtliche Erklärung	146

Abkürzungen

1 Abkürzungen

<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BALF	Brochoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat
BGM	<i>buffulo green monkey kidney cells</i>
bo	bovin
bp	Basenpaare
<i>C. b.</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
CAP	Chloramphenicol
D	Dugway 5J108-111
DC	Dendritische Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
H	Henzerling
H ₂ O	Wasser
HKG	<i>Housekeeping Gene</i>
HTS	<i>High Throughput Sampler</i>
hu	human
<i>icd</i>	Isocitratdehydrogenase
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen
IKZ	Inkubationszeit
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
KID ₅₀	Kulturelle Infektionsdosis 50 %
LCV	<i>large cell variants</i>
LPS	Lipopolysaccharid

Abkürzungen

LSM	Lymphozytenseperationsmedium
MDM	<i>monocyte derived macrophages</i>
MFI	mittleren Fluoreszenzintensität
MHCI/II	<i>major histocompatibility complex</i> der Klasse I bzw. II
ml	Milliliter
MLVA	<i>Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MW	Mittelwert
NBT	P-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Nml	<i>C. b.</i> -Stamm Nine mile RSA493 (Phase I)
Nml_HI	hitzeinaktivierte Suspension von <i>C. b.</i> -Stamm Nine mile RSA493 mile Phase I
NmII	Nine mile Phase II RSA439
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i>
<i>p. s.</i>	<i>post stimulation</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	R-Phycoerythrin
PV	phagolysomen-ähnliche parasitophore Vakuole
RLFP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RT	Raumtemperatur
S	Scurry Q217
SD	Standardabweichung
SCV	<i>small cell variants</i>
SLP	<i>spore like partikes</i>
TLR	<i>toll like</i> -Rezeptor
WP	Waschpuffer
ZK	Zellkontrolle
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

2 Zusammenfassung

Coxiella burnetii (*C. b.*) ist ein obligat intrazelluläres gram-negatives Bakterium und der Erreger der weltweit verbreiteten Zoonose Q-Fieber. Wichtigste Infektionsquelle für den Menschen stellen Wiederkäuer, wie Schafe, Ziegen und Rinder, dar (Maurin und Raoult 1999). Die Pathogenese von *C. b.* in seinen natürlichen Wirten wurde noch nicht hinreichend untersucht. Infektionsstudien mit Ziegen gaben einen ersten Einblick in die Pathogenese der Bakterien und die Immunantwort des Wirts (Roest et al. 2012, Roest et al. 2013, Ammerdorffer et al. 2014). Um das zoonotische Potential und die Virulenz von verschiedenen *C. b.*-Stämmen einzuschätzen, wird ein *In vitro*-System benötigt, an dem die Wirt-Pathogen-Interaktion zwischen *C. b.* und seinem primären Wirt untersucht werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *In vitro*-Zellkultursystem mit bovinen *monocyte derived macrophages* (MDM) etabliert, um die Interaktion von *C. b.* mit seinem Wirt auf zellulärer Ebene zu untersuchen. An diesem System wurde die bakterielle Replikation und die Wirtszellantwort nach einer Infektion mit 13 heterogenen *C. b.*-Stämmen analysiert, um daraus potentielle Biomarker zur Beurteilung der Virulenz von *C. b.* abzuleiten. Wirtsspezifische Unterschiede wurden mit vergleichenden Untersuchungen an humanen MDM überprüft. Die MDM beider Spezies wurden aus peripherem Blut generiert. Als vergleichendes System zu bovinen MDM wurden Alveolarmakrophagen aus der Lavage von Kälbern gewonnen. Die isolierten Zellen konnten anhand der Morphologie sowie der Expression von CD14 als Makrophagen identifiziert werden. Die Infektion der MDM erfolgte mit 13 *C. b.*-Stämmen, die auf ihre genetischen (MLVA, Plasmidtyp, *adaA*) sowie morphologischen (LPS-Phasentyp, Bakteriengröße) Eigenschaften untersucht und in einen Stammbaum eingeordnet wurden. Die Charakterisierung der bakteriellen Replikation erfolgte durch die Bestimmung der Lebendkeimzahl mit Hilfe einer Endpunkttitration auf BGM-Zellen (KID₅₀) sowie der Gesamtkeimzahl durch die Quantifizierung des *icd*-Gens (*real-time* PCR) über einen Zeitraum von 14 Tagen. Für die Bewertung der zellulären Wirtsreaktion wurde die Transkription von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen (*real-time* PCR) sowie die Expression von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche der Zellen (Durchflusszytometrie) bestimmt. Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration von IL-1 β in bovinen MDM intrazellulär (Western Blot) und extrazellulär (ELISA) ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen erstmalig, dass bovine MDM mit *C. b.* infizierbar sind und die Bakterien eine aktive Replikation durchlaufen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Infektion zu einer frühen Zellstimulation (3 h *p. i.*) mit einer dominierenden Expression von Th1-spezifischen Zytokinen, wie IL-1 β , IL-12 und TNF- α , führte. Trotz einer aktiven Replikation der Erreger sank im weiteren Verlauf der Infektion die transkribierte

Zusammenfassung

mRNA-Konzentration der untersuchten Zytokine und Chemokine signifikant ab. Eine immunsuppressive Wirkung der Bakterien konnte an der gehemmten Translation und Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β nachgewiesen werden. In bovinen Alveolarmakrophagen wurde ebenfalls eine aktive Replikation und frühe Induktion einer pro-inflammatorischen Wirtszellantwort durch *C. b.* beobachtet.

Für die Identifikation von potentiellen Biomarkern wurde die Interaktion von 13 *C. b.*-Stämmen mit bovinen und humanen MDM überprüft. Die Replikation der Bakterien in den MDM verlief stamm- und speziesspezifisch. In humanen MDM vermehrten sich Coxiellen effizienter als in bovinen Zellen. Unabhängig von der Spezies korrelierte das bakterielle Wachstum mit dem Genotyp und nicht mit dem LPS-Phasentyp oder der Herkunft der Stämme. Isolate der MLVA-Gruppe IV replizierten in bovinen und humanen MDM besonders effizient. Dagegen zeigten Stämme der MLVA-Gruppe III ein sehr schwaches Wachstum auf. Das Invasionsvermögen der Bakterien variierte ebenfalls stammspezifisch, korrelierte aber mit der Herkunft der Stämme. Humane Isolate sowie Stämme von Nagetieren oder Zecken invadierten wesentlich effizienter als von Wiederkäuern isolierte Stämme. Die untersuchte Wirtsreaktion unterschied sich in der Intensität der transkribierten Zytokine und Chemokine stamm- bzw. speziesspezifisch und verlief unabhängig von der Replikation. Die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , IL-8, IL-12 und TNF- α , dominierte in der frühen Infektionsphase (3 h *p. i.*). Die Intensität der Transkription korrelierte mit den Genotypen der Stämme. Eine sehr starke Wirtszellreaktion wurde vor allem von Isolaten aus der MLVA-Gruppe IV hervorgerufen. Dagegen reagierten MDM auf die Infektion mit Stämmen der MLVA-Gruppe I mit einer sehr schwachen Wirtszellantwort. Die Expression von Aktivierungsmarkern (CD40, CD80, CD86, MHC I/II) auf bovinen und humanen MDM wurde durch die *C. b.*-Infektion kaum verändert. Bovine und humane Makrophagen polarisierten in Folge der bakteriellen Stimulation zu einem atypischen M2-Phänotyp.

Zusammenfassend konnte ein Zellkultursystem mit Makrophagen etabliert werden, an dem die Interaktion von *C. b.* mit dem primären Wirt *in vitro* untersucht werden kann. Aus den Ergebnissen konnte eine Korrelation zwischen dem Genotypen der Stämme und der Replikationseffizienz sowie der induzierten Wirtszellantwort abgeleitet werden. Diese Resultate ähnelten den Beobachtungen in Nagetieren, die einen Zusammenhang zwischen dem Genotypen von *C. b.* und der Virulenz der Stämme vermuten ließen (Russell-Lodrigue et al. 2009). Genotypische Merkmale der Coxiellen könnten zukünftig dazu verwendet werden, um die Virulenz von nicht charakterisierten *C. b.*-Stämmen in Wiederkäuern und im Menschen bereits in der frühen Phase von Ausbruchsgeschehen abzuschätzen.

3 Einleitung

3.1 *Coxiella burnetii*

C. b. ist der Erreger des Q-Fiebers, einer weltweit auftretenden Zoonose. Entdeckt wurde dieses obligat intrazelluläre Bakterium unabhängig voneinander durch die Wissenschaftler Macfarlane Burnet und Herold Rea Cox. Burnet und sein Kollege Mavis Freeman isolierten 1937 erstmals den Erreger aus dem Probenmaterial von Schlachthofmitarbeitern aus Brisbane (Queensland, Australien), die an einer bis dahin unbekanntem fiebrigen Erkrankung litten und identifizierten diesen als *Rickettsiales*-Spezies (Burnet und Freeman 1937). Zeitgleich isolierten Gordon Davis und Cox in Ninemile Mountain (Montana, USA) den Erreger aus Zecken. Sie charakterisierten diesen als filtrierbar und schrieben ihm sowohl virale als auch bakterielle Eigenschaften zu. Rolla Eugene Dyer zeigte 1938 mit Infektionsstudien in Meerschweinchen, dass beide Isolate eine Kreuzimmunität aufwiesen (Dyer 1949). Bis zu diesem Zeitpunkt lautete der Name des Isolates *Rickettsia burnetii*. Cornelius B. Philip schlug im gleichen Jahr ein neues Genus für den Erreger vor und benannte die Spezies zu Ehren Cox's und Burnet's „*Coxiella burnetii*“ (McDade 1990).

3.1.1 Bakteriologie

C. b. ist ein kleines, unbewegliches, polymorphes Bakterium (0,2 bis 0,4 µm breit, 0,4 bis 1 µm lang), dessen Zellwandzusammensetzung der von gram-negativen Bakterien ähnelt (Maurin und Raoult 1999). Taxonomisch wird der Erreger anhand der 16S rRNA-Sequenz den gamma-Proteobakterien zugeordnet und bildet innerhalb der Ordnung *Legionellales* eine eigenständige Familie, die *Coxiellaceae* (Stein et al. 1993, Weisburg et al. 1989). Coxiellen kommen in der Umwelt in verschiedenen morphologischen Formen vor. So werden drei antigenetische Phasen – Phase I, Phase II und eine intermediäre Form – unterschieden. Die Phasenvariation beruht auf einer Veränderung der Lipopolysaccharid-Struktur (LPS), hervorgerufen durch chromosomale Deletionen, welche die O-Antigen-Biosynthese negativ beeinträchtigt (Hoover et al. 2002, Beare et al. 2006, Vodkin und Williams 1986). Die hochinfektiosen Bakterien der Phase I weisen ein vollständiges LPS auf und werden aus immunkompetenten Wirten isoliert. Phase II-Formen sind dagegen kaum infektiös und entstehen in Laboratorien in infizierten Zellkulturen oder embryonierten Hühnereiern nach mehrmaliger Passagierung. Die LPS-Struktur ist im Vergleich zur Phase I verkürzt. So fehlen die in Phase I-Partikeln vorhandenen Zucker L-Virenose, Dihydrohydroxystreptose und Galactosamin-Uranyl-alpha-(1,6)-Glucosamin (Schramek und Mayer 1982, Schramek et al. 1985, Hackstadt 1990). Virulente Phase I-Partikel werden nur begrenzt von der Wirtszelle internali-

sirt und überdauern in dieser meist unbemerkt einen längeren Zeitraum. Dagegen werden die avirulenten Phase II-Partikel von der Wirtszelle zunächst in großen Mengen aufgenommen und anschließend zügig eliminiert. Die Internalisierung der Bakterien erfolgt über eine rezeptorvermittelte Phagozytose. Phase II-Partikel binden hierfür die beiden Integrin-Rezeptoren $\alpha_V\beta_3$ (CD11b/CD18) und CR3 (Komplementrezeptor 3). Virulente Phase I-Partikel benötigen dagegen nur $\alpha_V\beta_3$ für die Aktivierung der Phagozytose und Aufnahme in die Zielzelle (Capo et al. 1999b). Die dritte LPS-Form ist eine intermediäre Form, welche eine Zwischenstufe aus beiden Phasentypen darstellt und wie Phase I Partikel eine Serumresistenz aufweist (Vishwanath und Hackstadt 1988, Hackstadt et al. 1985).

3.1.2 Entwicklungszyklus

Während des Entwicklungszyklus bilden Coxiellen zwei Bakterienzellformen aus, die sogenannten *small cell variants* (SCV) und *large cell variants* (LCV) (McCaul und Williams 1981). Beide Formen unterscheiden sich in ihrer Morphologie, Biologie und Ökologie voneinander. Die SCV sind stäbchenförmig mit einer Länge von 0,2 bis 0,45 μm und besitzen eine kompakte Zellwand sowie ein stark kondensiertes Chromatin. Sie stellen die extrazelluläre Form der Coxiellen dar und weisen anhand ihrer sporenhähnlichen Gestalt eine erhöhte Resistenz gegenüber physikalischen und chemischen Noxen (Hitze, Trockenheit, Kälte, UV-Strahlung, diverse Desinfektionsmittel) auf. So können SCV wochen- bis monatelang infektiös in Böden, Stäuben und Lebensmitteln, wie Milch und Fleisch, überdauern (BfR 2010). Diese hohe Tenazität begünstigt die Verbreitung der Bakterien in der Umwelt. Die LCV sind im Gegensatz dazu die aktiv replizierende intrazelluläre Form der Coxiellen und weisen eine pleomorphe Gestalt (bis zu 1 μm) mit einem deutlich ausgeprägten periplasmatischen Spalt auf (McCaul und Williams 1981). Nach Aufnahme der Bakterien in den Zielzellen - Monozyten und Makrophagen - kommt es im sauren Milieu (pH 4,5) der phagolysomenähnlichen parasitophoren Vakuole (PV) zur Umwandlung von SCV in metabolisierende LCV. Den niedrigen pH-Wert benötigen Coxiellen, um Nährstoffe für die Synthese von Nuklein- und Aminosäuren zu assimilieren (Omsland und Heinzen 2011). Während der Morphogenese kommt es zu einer vermehrten Expression verschiedener LCV-typischer Proteine, welche die metabolische Aktivität der Bakterien fördern (Minnick und Raghavan 2012). Mit der Aktivierung des Metabolismus der LCV beginnt die Reproduktion der Bakterien mit einer verhältnismäßig langsamen Generationszeit von rund 12 h (Coleman et al. 2004). Der Replikationszyklus endet mit der Morphogenese von LCV zurück in die widerstandsfähige Überdauerungsform (SCV). Neben der Kleinzellvariante gibt es noch eine dritte morphologische Form, die SDC (*small dense cells*), die sich von den SCV ableiten. SDC verfügen über eine bedeutende Toleranz gegenüber hohen Drücken ($\approx 1400 \text{ kg/cm}$), welche selbst SCV zerstören würden. Zudem exprimieren SDC nicht das hochkonservierte Membranprotein P1, welches bei SCV

geringfügig und LCV sehr häufig vorkommt (Varghees et al. 2002). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte eine vierte Form identifiziert werden, die SLP (*spore like partikes*). Es handelt sich dabei um membrangebundene Partikel, die eine sehr hohe Elektronendichte aufweisen. SLP haben einen Durchmesser von 0,13-0,17 µm und sind in den LCVs membrangebunden lokalisiert. Sie besitzen zudem einen Kern mit stark kondensierter DNA, der von Membranen und Peptidoglycan umhüllt ist. Die Funktion von SLP ist noch weitgehend unbekannt (Heinzen et al. 1999, McCaul und Williams 1981, Gurtler et al. 2014).

3.1.3 Genom und Stamm-Differenzierung

Das Genom der Coxiellen umfasst eine Länge von 1,9 bis 2,2 Mio Basenpaaren (van Schaik und Samuel 2012) und weist eine hohe Plastizität mit einer hohen Anzahl an mobilen Elementen und Pseudogenen auf (Beare et al. 2006). Die damit verbundene Vielzahl an *C. b.*-Stämmen und deren unterschiedlich ausgeprägte Virulenz erhöht die Bedeutung der Isolat-Charakterisierung für epidemiologische oder diagnostische Zwecke. Die Bakterien verfügen zudem über eines von vier Plasmiden - QpH1, QpRS, QpDG, QpDV - mit einer Länge von 32-51 Kilobasenpaaren oder eine QpH1-ähnliche chromosomal integrierte Sequenz (Mallavia 1991, Valkova und Kazar 1995, Willems et al. 1997). Aus vergleichenden Analysen konnte ein Zusammenhang zwischen der Plasmidausstattung der *C. b.*-Isolate und der Pathogenität abgeleitet werden. So wurden Stämme mit einem QpRS-Plasmid aus Patienten mit einer Endokarditis oder aus abortierenden Ziegen isoliert und mit der Ausprägung eines chronischen Q-Fiebers in Verbindung gebracht. Dagegen zeigten Isolate mit einem QpH1-Plasmid eine vermehrte Assoziation mit akuten Coxiellen-Infektionen (Samuel et al. 1985, Savinelli und Mallavia 1990). In anderen Studien konnten aus Patienten mit chronischen Krankheitsverläufen Isolate mit einem QpH1- oder QpRS-Plasmid isoliert werden, sodass eine generelle Assoziation der Virulenz eines *C. b.*-Isolats mit dem Plasmid nicht besteht (Thiele und Willems 1994). Um Gemeinsamkeiten oder Unterschiede der Stämme hinsichtlich der Virulenz sowie der antigenetischen oder epidemiologischen Eigenschaften aufzuzeigen, wurden verschiedene Methoden zur Genotypisierung der Bakterien anhand genomischer *fingerprints* etabliert. Eine gängige Methode zur Differenzierung stellt die RFLP- (Restriktionsenzym-längen-Polymorphismus) Analyse dar. Nach der Restriktion von bakterieller genomischer DNA mit spezifischen Enzymen konnten sechs verschiedene RFLP-Gruppen bei Coxiellen gebildet werden (Hendrix et al. 1991). In Infektionsmodellen mit Mäusen und Meerschweinchen wurden erste Zusammenhänge zwischen genetischen RFLP-Gruppen und der Virulenz von *C. b.* ersichtlich (Russell-Lodrigue et al. 2009). Neue Typisierungsmethoden könnten das Wissen über die Beziehung zwischen der genetischen Diversität und der Virulenz oder Epidemiologie von *C. b.* erweitern. Zu diesen Methoden gehören u. a. die MLVA- (*multiple loci variable number of tandem repeats*) oder MLST-Analyse (*multi locus*

sequence). Diese Methoden basieren auf natürlich vorkommenden kurzen Wiederholungen von Sequenzabschnitten im Genom. Zu den sogenannten *short sequence repeats* gehören u. a. *tandem repeats*, welche sich gut für die Typisierung von pathogenen Bakterien eignen (Lindstedt 2005). 2006 wurden erstmals 21 *C. b.*-Isolate mit der MLVA-Methode untersucht und fünf verschiedene genetische Gruppen sowie neun MLVA-Typen abgeleitet. Zudem wurden Parallelen zwischen den Genotypen und der epidemiologischen Verteilung der Stämme ersichtlich (Svraka et al. 2006). In weiteren Studien erwies sich die MLVA-Technik im Vergleich zur RFLP-Analyse als präzisere Methode zur Typisierung von *C. b.*-Isolaten (Arricau-Bouvery et al. 2006). Bei einer MLVA-Analyse von 103 untersuchten *C. b.*-Stämmen wurden vier genetische Gruppen (I bis IV) mit insgesamt 41 Genotypen gebildet. Die MLVA-Gruppen korrelierten dabei mit den genetischen Eigenschaften und der Verbreitung der Stämme sowie indirekt mit dem zugeordneten klinischen Bild. Die genomischen Gruppen I, III und IV verfügten über ein QpH1-Plasmid und das *adaA*-Gen. Stämme der MLVA-Gruppe II waren im Vergleich dazu sehr heterogen und variierten im Plasmidtyp (integrierte QpH1-Plasmidsequenz, QpH1, QpDV, QpRS) sowie im Vorhandensein von *adaA*. Zudem konnten anhand der genetischen Eigenschaften bei einer Vielzahl an Stämmen der Gruppe I und IV angenommen werden, dass sie eine akute *C. b.*-Infektion hervorrufen. Isolate aus der genetischen Gruppe II wurden wiederum häufig im Zusammenhang mit chronischen Ausprägungen des Q-Fiebers (Abort, Endokarditis oder Hepatitis) isoliert. Der Gruppe III konnte in dieser Studie dagegen kein spezifisches Krankheitsbild zugeordnet werden (Jiménez 2012).

3.1.4 Virulenzfaktoren

Über die Virulenzfaktoren von *C. b.* ist noch wenig bekannt. Dies liegt vor allem in der Schwierigkeit begründet, die Bakterien genetisch zu manipulieren. Mit der Möglichkeit des wirtszellfreien Wachstums im axenischen Medium ACCM wurden die ersten Grundlagen für die genetische Manipulation der Bakterien geschaffen, um spezifische Funktionen von Genen zu untersuchen (Omsland et al. 2009, Beare 2012).

Das LPS von *C. b.* ist bislang der einzig genetisch bestätigte Virulenzfaktor. Wie bei allen gram-negativen Bakterien spielt das LPS eine entscheidende Rolle in der Pathogenität (Heumann und Roger 2002). Die genaue Funktion des Coxiellen-LPSs als Virulenzfaktor ist noch nicht vollständig geklärt. Im Vergleich zu *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Salmonella typhimurium* ist die LPS-Toxizität von *C. b.* um das 100 bis zu 1000-fache reduziert (Amano et al. 1987). Dennoch sind Coxiellen der Phase I in der Lage immunkompetente Wirte zu infizieren, während Phase II Partikel rasch vom Immunsystem des Wirtes eliminiert werden (Hackstadt 1990). Verschiedene Merkmale begründen die Virulenzeigenschaften von Coxiellen-LPS. So sind Phase II-Bakterien sensitiv für das Komplementsystem, wohingegen Phase I-Partikel eine Resistenz gegenüber dem komplementinduzierten Membranangriffskomplex

Einleitung

des Wirtes ausgebildet haben (Vishwanath und Hackstadt 1988). Weiterhin inhibiert das Phase I-LPS die Bindung von Antikörpern, welche gegen die bakterielle Zellwand gerichtet sind (Hackstadt 1988). Die Struktur des langkettigen LPS soll zudem die Liganden für *toll-like*-Rezeptoren (TLR) von Zellen des angeborenen Immunsystems maskieren, was die Zellaktivierung verhindert und dem Erreger eine ungestörte Replikation in seinem Wirt ermöglicht (Shannon et al. 2005b). Ein weiterer Virulenzfaktor könnte das Oberflächenprotein OmpA sein. OmpA definiert das erste beschriebene Invasin bei Coxiellen. Eine Inhibierung des Proteins durch spezifische Antikörper hemmt die Internalisierung der Coxiellen (Martinez et al. 2014). Proteine der OmpA-Familie spielen bei diversen pathogenen Bakterien eine wichtige Rolle in der Pathogenese und sind u. a. an der Adhäsion, Invasion sowie der Umgehung der wirtseigenen Abwehrmechanismen beteiligt (Confer und Ayalew 2013).

C. b. verfügt über ein Typ IV-Sekretionssystem, welches dem Dot/Icm-System von *Legionella pneumophila* ähnelt (Zamboni et al. 2003). Dieser Membrankomplex ist an dem horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien, wie beispielsweise von Genen für Antibiotikaresistenzen oder Virulenzfaktoren beteiligt (Juhas et al. 2008). Einige obligat intrazellulär lebende Bakterien nutzen das Typ IV-Sekretionssystem für den Transport von virulenzspezifischen Proteinen und Nukleoproteinen durch die Zellmembran, um sich besser an ihre Umgebung anzupassen (Sexton und Vogel 2002). Die genaue Funktion des Typ IV-Sekretionssystems im Entwicklungszyklus von *C. b.* ist noch unbekannt. Einige Effektorproteine, die an der bakteriellen Replikation, der Reifung der PV und der Modulierung von wirtseigenen Signalwegen beteiligt sind, konnten bereits identifiziert werden (Weber et al. 2013, Lifshitz et al. 2014). Um im Milieu der PV zu überleben und den dort stattfindenden Degradierungsprozessen entgegenzuwirken, exprimieren Coxiellen verschiedene Enzyme, wie beispielsweise Superoxid-Dismutasen, Katalasen und Alkalische Phosphatasen (Heinzen et al. 1992, Baca et al. 1993). Diese Enzyme spielen eine essentielle Rolle im Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies, welche als metabolische Produkte in den Mitochondrien entstehen. Nach einer exogenen Stimulation können Zellen große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies als Abwehrmechanismus gegen Pathogene abgeben (Gamaley und Klyubin 1999). Durch die abbauende Wirkung der von *C. b.* exprimierten Enzyme werden die Mechanismen des oxidativen Stresses abgewehrt und die bakterielle Nische gesichert. Coxiellen besitzen zudem einen effektiven DNA-Reparaturmechanismus (*sos system*), welcher von *recA*, *ruvABC* und *addAb* gesteuert wird und das Überleben der Bakterien in Makrophagen fördert (Mertens et al. 2005, Mertens et al. 2008). Weitere Virulenzfaktoren könnten u. a. sein: das *ferric uptake regulator system* für die Regulierung der bakteriellen Eisenaufnahme (Briggs et al. 2005), das *adaA* Gen, welches vorrangig bei *C. b.*-Stämmen aus akuten Q-Fieber Ausbrüchen isoliert wurde (Zhang et al. 2005) oder der Legionella-ähnliche Virulenzfaktor *macrophage infec-*

tivity potentiator, welcher eine Rolle beim Transport und der Faltung von Proteinen spielt (Cianciotto et al. 1995, Mo et al. 1995).

3.1.5 Epidemiologie

C. b. ist mit der Ausnahme von Neuseeland weltweit verbreitet. Das Reservoir von *C. b.* ist sehr weitläufig und umfasst viele wildlebende Säugetiere, Haustiere, Vögel und Anthropoden, wie beispielsweise Zecken. Etwa 40 verschiedene Zeckenspezies sind natürlich mit dem Bakterium infiziert. Coxiellen vermehren sich vorrangig im Darm sowie im Magen und werden über den Kot ausgeschieden. Zecken gelten somit als endemisches Reservoir und spielen als Vektoren im natürlichen Infektionszyklus vor allem bei wildlebenden Säugetieren sowie Hunden eine wichtige Rolle (Maurin und Raoult 1999). Der Mensch infiziert sich vorrangig über den Kontakt mit Nutztieren (Schafe, Ziegen Rinder) und Haustieren (Katzen, Hunde). Die Übertragung der Bakterien erfolgt über die Inhalation von erregerehaltigen Aerosolen, entstanden aus kontaminiertem Urin, Kot oder Geburtmaterial (Fruchtwasser, Nachgeburt) der betroffenen Tiere. Eine Infektion durch das Einatmen von getrocknetem Zeckenkot oder aufgrund eines Zeckenbisses ist äußerst selten (Angelakis und Raoult 2010). Bei Tieren verläuft die Infektionsroute neben dem aerogenen Weg auch über den oralen Kontakt durch das Belecken von Nachgeburten oder die direkte Aufnahme von kontaminiertem Heu, Stroh oder Weidegras (Woldehiwet 2004). *C. b.* weist eine hohe Infektiosität auf. So wird davon ausgegangen, dass die Aufnahme von bereits 1 bis 10 Partikel für die Entwicklung einer Primärinfektion ausreichend sind (Tigertt et al. 1961). Auch diese Eigenschaft führt dazu, dass *C. b.* laut der BioStoffV/EU-Richtlinie 90/679/EWG 1999 in die Risikogruppe 3 einordnet wird und Arbeiten mit dem Bakterium nur in Laboratorien der Schutzstufe 3 durchgeführt werden dürfen.

3.2 Q-Fieber und Coxiellose

C. b. verursacht beim Menschen die zoonotische Erkrankung des Q-Fiebers. Die Inkubationsdauer beträgt 2 bis 3 Wochen. Die Primärinfektion verläuft in 60 % der Fälle asymptomatisch. Nur etwa 40 % der Patienten entwickeln Symptome (Maurin und Raoult 1999). Die akute Infektion manifestiert sich meist mit milden grippeähnlichen Symptomen und nur in wenigen Fällen kommt es zu schweren Verläufen wie einer atypischen Pneumonie oder Hepatitis. Etwa 2-5 % der Patienten mit einer Primärinfektion entwickeln nach vielen Monaten bis Jahren ein chronisches Q-Fieber. Die chronische Infektion ist häufig gekennzeichnet durch das Auftreten von Endokartiden (78 %) oder vaskulären Infektionen (9 %). Schwangere Frauen sind bei einer *C. b.*-Infektion besonders gefährdet (Raoult et al. 2005). Q-Fieber während der Schwangerschaft kann zu frühzeitigen Entbindungen (44,7 %), spontanen Abor-

Einleitung

ten (26 %), Totgeburten (5,3 % intrauteriner Fruchttod) oder zu einer eingeschränkten Entwicklung des Fötus (5,3 %) führen (Tissot-Dupont und Raoult 2008, Carcopino et al. 2009). Beim Tier wird die Erkrankung nach Infektion mit *C. b.* als Coxiellose bezeichnet. Diese verläuft zumeist inapparent. Infizierte Tiere entwickeln im weiteren Verlauf häufig eine chronische Infektion. Dabei scheiden sie persistent Bakterien über den Urin, Kot, Milch oder Geburtsprodukte aus (Maurin und Raoult 1999). Chronisch infizierte Rinder sondern die Erreger über einen Zeitraum von mehreren Jahren über die Milch, die Geburtsprodukte und den Kot ab. Rinder könnten somit neben kleinen Wiederkäuern ein wichtiges Reservoir für die Übertragung auf den Menschen darstellen (Biberstein et al. 1974, Guatteo et al. 2006). Die Seroprävalenz in Rindern nahm in den letzten Jahren deutlich zu. Sero-positive Herden wurden vor allem in Milchbetrieben und vermindert in Fleischbetrieben nachgewiesen. Eine starke Seroprävalenz in Milchvieh-Herden konnte in verschiedenen europäischen Ländern mit 79 % in den Niederlanden, 71 % in Belgien, 67 % in Nordspanien und 65 % in Irland festgestellt werden. Die Zunahme wird mit der Herdengröße und der überproportional steigenden Anzahl an Milchbetrieben in Relation zu Fleischbetrieben erklärt (Agger und Paul 2014, McCaughey et al. 2010). Das Risiko der Übertragung von *C. b.* durch sero-positive Rinder ist hoch. In einer niederländischen Studie mit 3000 getesteten Milchbetrieben wurde eine Seroprävalenz von 72 % bei Rindern und 87,2 % bei den Mitarbeitern der Betriebe detektiert (Schimmer et al. 2014). Die Zahl der nachgewiesenermaßen von Rindern ausgehender Q-Fieber-Ausbrüche ist deutlich geringer als die von kleinen Wiederkäuern. In Deutschland gingen von 40 Q-Fieber-Ausbrüchen in einem Zeitraum von 1947-1999 nur sechs Ausbrüche von Rindern aus, 24 dagegen vom Schaf und die restlich 10 von u. a. Ziegen (Hellenbrand et al. 2001). Gründe hierfür werden in der Form der Ausscheidungswege der Bakterien gesehen. Drei verschiedene Routen der bakteriellen Ausscheidung werden beschrieben: über die Milch, den Kot oder Geburtsprodukte. Bei Rindern erfolgt eine kontinuierliche Abgabe der Bakterien primär über die Milch. Bei kleinen Wiederkäuern kommt es dagegen neben der Milch (bei Ziege) auch zu einer deutlich vermehrten Ausscheidung über den Urin oder vaginalen Zervixschleim (Schaf), welche jedoch saisonal bedingt schwankt. Eine Aerosolbildung ist bei Milch eher geringer einzuschätzen als bei Geburtmaterial oder Urin bzw. Kot. Damit könnte die geringe Zahl an Q-Fieber-Ausbrüchen, hervorgerufen durch das Rind, erklärt werden. Jedoch sollte das Gefährdungspotential, welches vom Rind ausgeht, nicht unterschätzt werden (Hilbert et al. 2015). Die langandauernde dominierende Ausscheidung über die Milch bei Rindern führt über das Säugen der Kälber zu einer vermehrten Verbreitung von *C. b.* in klinisch unauffälligen Herden. Zusätzlich scheiden Kälber, die infektiöse Milch aufgenommen haben, die Bakterien vermehrt über den Kot und den Urin aus, sodass die umliegende Umwelt kontaminiert wird (Rodolakis et al. 2007, Rodolakis 2009).

Einleitung

Die Diagnostik auf Herdenebene erfolgt vorrangig über den bakteriellen DNA-Nachweis mit Hilfe einer *real-time* PCR oder über einen Antikörper-Nachweis mit einem ELISA. Beide Methoden weisen Mängel in der Sensitivität oder Spezifität auf (Henning und Sting 2002). So kommt es bei Ausscheidern immer wieder zu falsch-positiven oder negativen Ergebnissen (Rodolakis 2009). Die Zu- und Abkäufe zwischen Betrieben erhöht somit trotz Testung das Risiko einer Einschleppung der Erreger in eine Q-Fieber-freie Herde (Cardinale et al. 2014). Um eine weitere Ausbreitung zu verhindern, werden verschiedene Desinfektionsmaßnahmen der Stallung, besonders der Abkalbeboxen, die zeitnahe Entfernung und Beseitigung von Plazenten oder der Einsatz von Antibiotika bzw. Vakzinen angewandt. Eine Behandlung mit Tetracyclin (20 mg/kg) innerhalb der letzten Monate der Trächtigkeit soll die Abortzahl reduzieren. Die Effizienz dieser Methode ist jedoch nicht hinreichend geprüft, da es trotz Behandlung zu Aborten und zur Ausscheidung des Erregers kommt (Rodolakis 2009). Die Vakzinierung stellt derzeit die effizienteste Methode zur Eindämmung des Erregers dar. In der veterinärmedizinischen Anwendung sind zwei Tot-Impfstoffe Coxevac (CEVA Sante Animale, Phase-I-Impfstoff) und Chlamyvac FQ (MERIAL, Phase-II-Impfstoff) international verfügbar. Beide Wirkstoffe wurden experimentell in trächtigen Ziegen nach einer *C. b.*-Infektion getestet. Nur Coxevac verhinderte den Abort sowie die Ausscheidung von Erregern über die Milch, Vaginalschleimhaut sowie Kot. Der Phase-II-Tot-Impfstoff zeigte keine Wirkung (Arricau-Bouvery et al. 2005). Während eines Langzeitversuchs (> 4 Jahre) in einem Schafsbestand konnte durch Coxevac eine dauerhafte Inhibierung der Ausscheidung der Erreger sowohl bei Mutterschafen als auch bei Jungtieren erzielt werden (Astobiza et al. 2011). Der Phase-I Totimpfstoff hat das prophylaktische Potenzial sowohl bei infizierten Herden als auch bei nicht infizierten Beständen die Verbreitung der Erreger in der Umwelt zu reduzieren (Rodolakis 2009). Für die Entwicklung eines effektiven Schutzes sind Impfstrategien, welche die Dauer und die Wiederholung der Behandlung definieren, entscheidend. In einer über 10 Jahre andauernden Langzeitstudie bei Rindern wurde nachgewiesen, dass die Vakzinierung von Rindern und Jungtieren den effektivsten Schutz in Form einer Reduktion der Abortzahlen, der Ausscheider sowie der bakteriellen Last in der Umwelt ergaben (Courcoul et al. 2011). Mit der Einführung der Impfung konnte die Ausscheidungslast der Erreger reduziert und das Gefährdungspotential für den Menschen eingedämmt werden (Hogerwerf et al. 2011). Eine prophylaktische Behandlung beim Menschen ist derzeit nur in Australien mit einem hitzeinaktivierten Ganz-Zell-Vakzin (Q-Vax) vom Stamm Henzerling möglich. Das hier verwendete Präparat wird vorrangig Schlachthausmitarbeitern, Veterinärmedizinern sowie dem Personal von landwirtschaftlichen Betrieben und den direkten Angehörigen verabreicht. Die Wirksamkeit der Vakzine wurde in Affen, Meerschweinchen und Mäusen erfolgreich getestet (Arricau-Bouvery und Rodolakis 2005).

3.3 Biomarker

Um diagnostische Mittel zur Früherkennung von Infektionen oder nicht-infektiösen Erkrankungen zu entwickeln, sind Biomarker wichtige Indikatoren. Ein Biomarker definiert objektiv messbare Parameter, die einen biologischen Prozess nach dem Einwirken eines Pathogens, Pharmazeutikums oder in Folge von anderen Erkrankungen, wie Autoimmunerkrankungen, Alzheimer oder Krebs, beschreiben (Schmitz 2008). Darüber hinaus werden diese Marker zur Erkennung von Krankheitsbildern herangezogen. Das Finden von geeigneten Biomarkern ist mit einer Prüfung der Relevanz und der Validität in Frage kommender Verfahren verbunden. Dafür muss zunächst herausgefunden werden, welche Parameter sich bei einer Erkrankung verändern (Strimbu und Tavel 2010). Parameter können sowohl auf der Seite des Wirtes, dem Rezeptor, als auch beim Sender, dem Agens, gefunden werden. Besonders bei Erkrankungen, die durch ein Pathogen (Sender) verursacht werden, können genetische Merkmale dieses Erregers (Polymorphismen, Plasmide, Toxin-Bildung oder Resistenzen) entscheidend in der Diagnostik und der Behandlung bzw. der Prophylaxe sein. Beim Wirt können Biomarker nur in Folge eines Kontakts mit dem Agens identifiziert werden. Es kommt hierbei zu Veränderungen der Zusammensetzung von Körperflüssigkeiten (Blut, Lymphe, Verdauungssäfte, Schweiß, Urin), welche als Indikatoren dienen können (Abbildung 1) (Schmitz 2008). Nach der Relevanzprüfung erfolgt die Validierung. Diese ist zeitaufwendig und benötigt eine hohe Stichprobenzahl. Nach positivem Abschluss beider Prüfprozesse kann ein Biomarker einem biologischen Prozess zugeordnet und für die Etablierung von diagnostischen Verfahren angewandt werden (Strimbu und Tavel 2010).

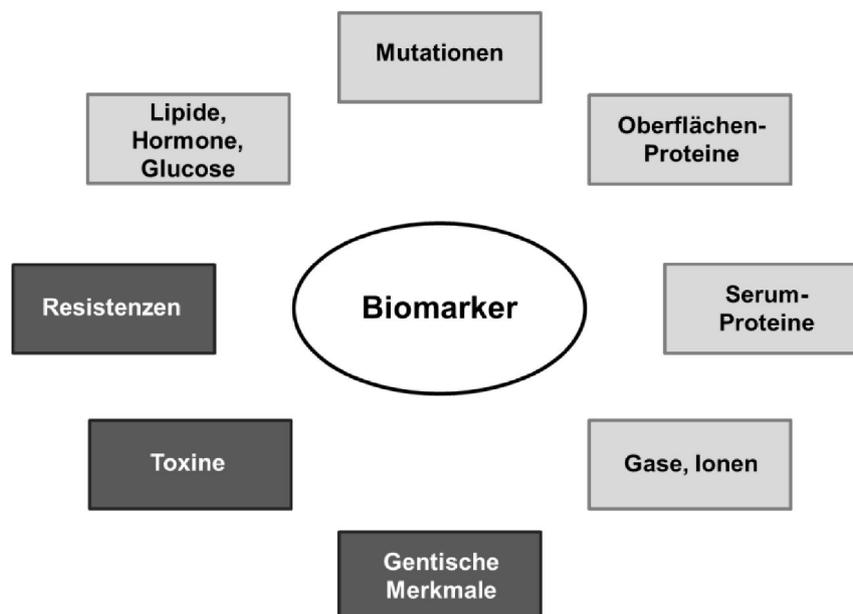


Abbildung 1: Diversität von Biomarkern. Dargestellt sind Einflussfaktoren des Wirtes (hellgrau) und des Pathogens (dunkelgrau), an dem ein Biomarker definiert werden kann.

Ein Anwendungsfeld sind Infektionskrankheiten, wie beispielsweise die Sepsis. Diese unkontrollierte Inflammation, welche sowohl durch Bakterien als auch Pilze hervorgerufen wird, führt zu einer sehr hohen Mortalitätsrate mit kontinuierlich ansteigenden Fallzahlen (Martin 2012). Da sich die antimikrobielle Therapie bei einer Infektion durch Bakterien von der pilzverursachten Erkrankung unterscheidet, muss eine schnelle Diagnostik erfolgen. In einem Blutzellmodell konnten verschiedene Wirtsgene als Biomarker identifiziert werden, deren Expression sich zwischen den Bakterien, Pilzen sowie einer nicht infizierten Kontrolle unterscheiden (Dix et al. 2015). Potentielle Biomarker konnten auch bei Infektionen mit intrazellulären Bakterien nachgewiesen werden. Bei Mykobakterien sollen bakterielle Adhäsine, welche die Immunantwort des Wirtes stimulieren, für die Etablierung von diagnostischen Verfahren als Biomarker verwendet werden (Govender et al. 2014). Bei chlamydialen Genitalinfektionen in Mäusen variiert die klinische Ausprägung pathotypspezifisch. Anhand von Unterschieden im Expressionsprofil von immunregulatorischen micro-RNAs kann bereits im frühen Stadium der Infektion eine Klassifizierung des Pathotyps erfolgen und einer weitere Pathogenese durch eine gezielte Behandlung entgegengewirkt werden (Yeruva et al. 2014).

Bei Coxiellen sind viele verschiedene Stämme beschrieben, die sich in ihrem Ursprung, der genetischen Eigenschaften und der Pathogenese des Q-Fiebers unterscheiden. Definierte Parameter, die die Virulenz eines *C. b.*-Stammes oder den Erkrankungsverlauf beschreiben, sind derzeit nicht bekannt.

3.4 Das Immunsystem des Wirtes

Das Immunsystem des Wirtes ist eine effektive Waffe zur Bekämpfung von Pathogenen. Es unterteilt sich in das angeborene und das adaptive Immunsystem.

3.4.1 Makrophagen

Makrophagen sind durch ihre phagozytotischen Eigenschaften wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Sie nehmen eine zentrale Rolle in der Bekämpfung von Pathogenen sowie der Beseitigung von extrazellulären Eigen- und Fremdmaterialien ein. Makrophagen gehören zu den mononukleären Zellen und differenzieren sich aus peripheren Monozyten, welche im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen entstehen. Nach externen Stimuli können Monozyten aus dem Blut in die Gewebe migrieren und zu langlebigen gewebspezifischen Makrophagen differenzieren (Shi und Pamer 2011). Dort reagieren sie auf Fremdeinflüsse und übernehmen gewebspezifische Aufgaben in der Immunantwort. Makrophagen weisen zudem eine hohe Plastizität und Flexibilität auf und können durch externe Stimulation in diverse Subpopulationen differenzieren. Diese Populationen sind durch die Expression verschiedener Zytokine, Chemokine und Oberflächenmarker gekennzeichnet.

Einleitung

Die klassische Einteilung der Makrophagen, basierend auf Untersuchungen im Mausmodell, unterscheidet zwei Subpopulationen: die klassisch aktivierten M1- Makrophagen und die alternativ aktivierten M2-Makrophagen. M1-Makrophagen werden durch die Stimulation von TLR sowie IFN- γ aktiviert und induzieren durch die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , IL-12, TNF- α , IL-23, eine TH₁- und TH₁₇-lastige Immunantwort. Zudem sezernieren sie vermehrt Stickoxide, wie NO und Hyperoxide, die eine starke antimikrobielle Wirkung aufweisen. Mit der Ausschüttung von Stickoxidverbindungen kommt es gleichzeitig zur Schädigung des umliegenden Gewebes und zur Ausweitung der Entzündungsreaktion (Murray und Wynn 2011b). M1-Makrophagen exprimieren zudem diverse Oberflächenmarker, wie CD32, CD64, CD40, CD80/86 (Vogel et al. 2013). Makrophagen, die mit IL-4 oder IL-13 stimuliert werden, differenzieren zu M2-Makrophagen. Diese erzeugen durch die vermehrte Expression von Zytokinen, wie IL-10 und TGF- β , sowie dem Enzym Arginase I eine anti-inflammatorische Immunantwort und sind an der Wundheilung beteiligt. Charakteristisch für den M2-Phänotyp ist die Expression des Mannose-Rezeptors und CD163 auf der Zelloberfläche. Die strikte Einteilung der Makrophagen in M1 und M2 wurde seit einigen Jahren aufgelockert. Heute wird eine flexible Klassifizierung von drei Subpopulationen (klassisch aktivierten Makrophagen, regulatorische Makrophagen, Wundheilungsmakrophagen) verwendet, deren Grenzen sich vermischen und zu diversen Abstufungen im Aktivierungsgrad führen (Mosser und Edwards 2008, Pollard 2009). Die grundlegende Eigenschaft der Makrophagen für die Beseitigung von apoptotischen Zellen sowie Pathogenen ist die Fähigkeit zur Phagozytose. Elie Metchnikoff entdeckte die Phagozytose im Seestern und übertrug diese Entdeckung, der Befähigung von spezialisierten Zellen Fremdmaterial aufzunehmen und abzubauen, auf das adaptive Immunsystem der Vertebraten und erhielt dafür 1908 den Nobelpreis (Gordon 2007, Gordon 2008). Die Aufnahme der extrazellulären Materialien erfolgt über den direkten Kontakt mit verschiedenen Rezeptoren (u. a. TLR, Mannose- und Komplement-Rezeptoren) oder indirekt über Opsonine (*LPS binding protein*, Thrombospondine, Collectine). Nach Bindung an diese Rezeptoren kommt es abhängig vom Liganden zur Aktivierung von spezifischen Signalkaskaden. Bei mikrobieller Herkunft führt die Stimulation zur Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Fragmente apoptotischer Zellen induzieren eine anti-inflammatorische Immunantwort. Mit der Adhäsion an die Rezeptoren erfolgt die Aufnahme durch die Aktivierung der Aktin-Polymerisierung und damit die Internalisierung des Fremdpartikels in ein Phagosom. Dieses frühe Phagosom fusioniert im weiteren Verlauf mit Endosomen und Lysosomen zum Phagolysosomen. Dabei kommt es zur schrittweisen Ansäuerung des Kompartiments und zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, antimikrobiellen Proteinen und Peptiden, welche zu einem Abbau des Fremdpartikels führen. Dem schließt sich die Prozessierung der Antigene und die Präsentation mikrobieller Peptide über MHC-Moleküle sowie die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen an, die zur

Aktivierung des adaptiven Immunsystems führen (Flannagan et al. 2012, Stuart und Ezekowitz 2005).

3.4.2 T-Zell-Klassifizierung und Aktivierung

Antigen-präsentierende Zellen (APZ), wie Makrophagen und dendritische Zellen (DCs), sind entscheidend für die Aktivierung von T-Zellen. Diese Immunzellen gehören neben den B-Zellen zu den Haupteffektorzellen des adaptiven Immunsystems und werden in sechs Subtypen unterteilt. Eine Unterklasse beschreibt die T-Helferzellen, die sich wiederum in die Untergruppen der Th1-, Th2- und Th17-Zellen aufgliedern (Zhu und Paul 2010). Th1-Zellen induzieren eine typische Entzündungsreaktion durch die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IFN- γ , TNF sowie IL-2, und spielen eine entscheidende Rolle in der Kontrolle von Infektionen. Th2-Zellen interagieren dagegen mit B-Zellen. Letztere leiten nach Bindung kostimulierender Oberflächenantigene sowie Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, die Produktion und Freisetzung von Antikörpern ein (Romagnani 1991). Th17-Zellen exprimieren vorrangig IL-17 und IL-22. Sie sind an den Abwehrmechanismen gegen extrazelluläre Erreger und an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen oder allergischen Reaktionen beteiligt (Hirota et al. 2010). Für die T-Zellaktivierung ist ein komplexes Netzwerk aus Rezeptor-Liganden-Bindungen notwendig, welches qualitativ und quantitativ die Immunantwort steuert (Bour-Jordan und Bluestone 2009). Dieser Komplex besteht primär aus dem T-Zell-Rezeptor und dem MHC-Molekül-gebundenen Antigen, welches auf den APZ lokalisiert ist. Für eine stabile Bindung spielen verschiedene kostimulierende Faktoren eine entscheidende Rolle, die auf den APZ exprimiert und durch Rezeptoren auf den T-Zellen erkannt werden. Zu den Ko-Faktoren gehören u. a. CD40, CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2). Diese binden an die Rezeptoren CD40L (CD40) und CD28 (B7) (Smith-Garvin et al. 2009). Der B7-CD28 Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der T-Zell-Aktivierung sowie der Immuntoleranz. Die Interaktion von B7-Molekülen mit CD28 fördert u. a. durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren das Überleben von T-Zellen, die Sekretion von Zytokinen (IL-2) und die Expression des CD40L-Rezeptors. B7-Moleküle können zudem auch an CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) binden. Diese Interaktion unterstützt die periphere T-Zell-Toleranz durch eine Inhibition des Zellzyklus und der Freisetzung von IL-2 (Sharpe und Freeman 2002). Die Bindung der kostimulierenden Faktoren führt zur Proliferation der naiven T-Zellen. Für die weitere Entwicklung der naiven T-Zelle zu einer optimalen Effektor-T-Zelle oder Gedächtniszelle sind pro-inflammatorische Zytokine als drittes Signal zur Stimulation erforderlich (Mescher et al. 2006, Pape und Jenkins 1998).

3.4.3 Zytokine und Chemokine

Zytokine sind kleine Peptidstrukturen mit einer Molekülmasse von 8 bis 40 kDa. Sie sind an der Regulierung der Immunantwort, der Inflammation, sowie der Traumaentwicklung beteiligt. Die Einteilung erfolgt nach ihrem Wirkungsspektrum. Pro-inflammatorische Zytokine fördern aktiv die Entwicklung einer Inflammation. Im Gegensatz dazu reduzieren oder hemmen anti-inflammatorische Zytokine den Prozess der Wundheilung und die Inflammation. Zytokine werden von diversen Zellen sekretiert. Die primären Zellen der Zytokinsynthese sind jedoch Th-Zellen und Makrophagen. Die Sekretion der Zytokine spielt eine essentielle Rolle in der Kommunikation und Interaktion zwischen Zellen (Zhang und An 2007). Dieses Netzwerk steht unter einer strikten Kontrolle durch Zytokininhibitoren und zellassozierte sowie nicht-zellassozierte Zytokinrezeptoren (Opal und DePalo 2000). Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören u. a. IL-1, TNF, IFN- γ sowie diverse Chemokine, wie beispielsweise IL-8. Chemokine sind kleine Proteine mit einer Molekülmasse von 7 bis 15 kDa. Sie werden durch primäre Mediatoren, wie IL-1 und TNF induziert und wirken chemotaktisch auf die Migration von Lymphozyten zum Infektionsherd. Vier Subfamilien werden anhand der Position von Cystein-Resten unterschieden (C, CC, CXC, CX3C). Diese differenzieren in ihrer Fähigkeit der Chemotaxis (Melik-Parsadaniantz und Rostene 2008). So locken beispielsweise die Vertreter der CXC-Familie, wie IL-8, vor allem neutrophile Zellen an und Chemokine der CC-Gruppe, wie MCP-1, induzieren die Migration von Monozyten sowie Subtypen von CD4⁺, CD8⁺-Zellen und T-Zell-Gedächtniszellen (Graves und Jiang 1995).

Anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 und TGF- β , oder nicht-zellassozierte Rezeptoren, wie IL-1ra, wirken inhibierend auf die Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen. Die Klassifizierung der Th-Zellen erfolgt nach der Sekretion der Zytokine. Th1-Zellen sondern vorrangig pro-inflammatorische Zytokine ab. Diese führen zur Aktivierung von Makrophagen und leiten eine zellvermittelte Immunreaktion gegen intrazelluläre Pathogene ein. Th2-Zellen exprimieren dagegen anti-inflammatorische Mediatoren, welche eine humorale Immunantwort induzieren und sich gegen extrazelluläre Erreger richten (Opal und DePalo 2000, Romagnani 1991). Die Differenzierung der naiven Th-Zellen zu Th-Subtypen erfolgt über die Stimulation von Zytokinen, wie IFN- γ und IL-4, sowie die Bindung von APZ-assozierten Oberflächenmolekülen (Feili-Hariri et al. 2005). Zwischen den Th-Subtypen 1 und 2 besteht eine theoretische Balance, die 1986 in Mäusen postuliert wurde. Bei Infektionen oder Autoimmunerkrankungen wird die Balance gestört und fällt in ein Ungleichgewicht, welches zur Aufhebung der Immuntoleranz führt (Kidd 2003). Eine strikte Regulierung zur Aufrechterhaltung der Balance ist somit notwendig. Besonders die Wirkung der pro-inflammatorischen Zytokine wird stark kontrolliert (Dinarello 2000). Neben dem Einfluss von anti-inflammatorischen Zytokine, wie IL-10, IL-13 oder TGF- β , spielen ebenfalls molekularbiologi-

sche Regulationsmechanismen eine entscheidende Rolle. So werden beispielsweise die Zytokine IL-1 β und IL-18, im Gegensatz zu anderen pro-inflammatorischen Zytokinen, als inaktive Vorläuferform im Zytoplasma exprimiert, welche durch Caspase 1 in die bioaktive Form gespalten und anschließend von der Zelle sekretiert wird (Dinarello 1998). Zudem stehen Zytokine und Chemokine in einer Synergie zueinander. So werden Chemokine erst durch die Stimulation von Zytokinen, wie IL-1, induziert, was wiederum zu einer gesteigerten Migration von Granulozyten sowie T-Zellen führt. Dieses kausale Zusammenspiel steigert unter kontrollierten Bedingungen die Wirkung der einzelnen Mediatoren (Gouwy et al. 2005).

3.5 Einfluss von *C. b.* auf die Wirtszelle und die Immunantwort

C. b. als obligat intrazellulärer Erreger steht mit seinem Wirt in einer parasitären Beziehung. Eine Infektion führt zu einer Reaktion des Wirtes, die auf das Eindämmen bzw. Beseitigen des Erregers abzielt und zur Klassifizierung von Biomarkern genutzt werden kann. Zur Kontrolle einer akuten Q-Fieber-Infektion sind eine zellvermittelte Immunantwort und die Bildung von Granulomen essentiell. Die Sekretion von Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α , stimuliert die antimikrobielle Antwort einer Vielzahl von Zelltypen und leitet damit die Kontrolle der Infektion und die Eindämmung des Infektionsherdes ein (Shannon und Heinzen 2009). Chronische Infektionen sind dagegen durch eine eingeschränkte zellvermittelte Immunantwort mit einer reduzierten Granulombildung und einer erhöhten Expression von IL-10 charakterisiert.

3.5.1 Angeborenes Immunsystem

C. b. weist einen erhöhten Tropismus zu Monozyten und Makrophagen, wie Alveolarmakrophagen und Kupffer-Zellen in der Leber auf (Khavkin und Tabibzadeh 1988, Stein et al. 2005). Die Phagozytosefähigkeit dieser Zellen ist ein essentieller Mechanismus zur Eliminierung von Pathogenen, wie Bakterien, Viren und Parasiten (Taylor et al. 2005). Coxiellen nutzen hingegen diese Zelleigenschaft, um über eine rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle zu gelangen. Die Invasion ist phasenabhängig und erfolgt über die Bindung an CR3 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf der Oberfläche der mononukleären Zellen. Phase I-Partikel invadieren durch die Bindung an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und werden im Verhältnis zu Phase II Partikeln, die zusätzlich noch CR3 benötigen, nur mäßig von der Zelle aufgenommen (Capo et al. 1999b). CR3 vermittelt die Internalisierung vieler Erreger. Die Bindungsaffinität des Rezeptors wird durch die Bindung von Kofaktoren, wie $\alpha_v\beta_3$ -Integrin sowie CD47, gesteigert (Hajishengallis und Lambris 2011, Ishibashi et al. 1994). Avirulente Phase II-Partikel werden durch die Aktivierung von CR3 besser internalisiert und eliminiert. Der CR3-Rezeptor spielt somit eine wichtige Rolle für die Virulenz der Coxiellen (Capo et al. 1999b). Virulente Phase I-Partikel induzieren bei Monozyten eine zytoskelettvermittelte Aufnahme der Bakterien

Einleitung

(Meconi et al. 1998). Invasine spielen bei diesem Prozess eine wichtige Rolle. Bakterien mit einem Typ III-Sekretionsmechanismus injizieren diese Proteine direkt in die Wirtszelle, was zu einer Veränderung des Zytoskelettes und zur Internalisierung führt. Bakterien ohne Typ III-Sekretionsmechanismus, sogenannte „Zipper“ Bakterien nutzen dagegen oberflächengebundene Proteine, die nach Kontakt mit der Wirtszelle zu einer Aufnahme des Pathogens führen (Pizarro-Cerda und Cossart 2006). Coxiellen verfügen über ein Typ IV-Sekretionssystem und haben auf ihrer Oberfläche das Invasin OmpA lokalisiert, welches nach Bindung an die Wirtszelloberfläche eine Internalisierung der beiden Phasentypen bewirkt (Martinez et al. 2014). Bakterienbestandteile, wie LPS oder Peptidoglycan, fungieren als *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) und aktivieren nach der Bindung von TLR's, wie beispielsweise TLR4 oder 2, die angeborene und adaptive Immunantwort (Underhill und Ozinsky 2002). TLR4 wird durch das LPS von gram-negativen Bakterien aktiviert und ist an der Internalisierung von Phase I-, aber nicht von Phase II-C. *b.*-Partikeln in Makrophagen beteiligt (Honstetter et al. 2004). Der Rezeptor spielt zudem eine wichtige Rolle am *C. b.*-bedingten Zytoskeletumbau (West et al. 2004). Mit dem Umbau der Aktin-Strukturen werden durch Tyrosin-Kinase gesteuerte Signalwege aktiviert, welche zur Expression verschiedener Zytokine führen (Meconi et al. 2001, Napolitani et al. 2003). Neben der Aktivierung der Zytokinexpression löst eine Stimulation von TLR4 durch bakterielles LPS eine vermehrte Granulombildung aus. Die Beseitigung der Coxiellen nach der Phagozytose erfolgt jedoch nicht durch TLR4-induzierten Mechanismen (Honstetter et al. 2004).

TLR2-Rezeptoren werden durch das Peptidoglycan sowie durch Lipopeptide von gram-positiven Bakterien, Hefen und Mykobakterien aktiviert. Die Stimulierung führt zu einer verstärkten Induktion der Zytokinexpression, welche die Polarisierung sowie Differenzierung der T-Zellen beeinflusst (Borrello et al. 2011, Underhill und Ozinsky 2002). Der TLR2-Rezeptor wird durch das LPS von *C. b.* aktiviert und spielt eine Rolle in der Entwicklung der Infektion. Die Zytokinexpression von pro-inflammatorischen Mediatoren, wie TNF- α sowie IL-12, wird in TLR2-defizienten murinen Makrophagen nach einer *C. b.*-Infektion mit einem Phase II-Partikel im Vergleich zum Wildtypen bzw. zu TLR4-defizienten Zellen deutlich eingeschränkt. Zudem sind TLR2-defiziente Mäuse deutlich permissiver für die Replikation von *C. b.* (Zamboni et al. 2004). Murine *In vivo*-Experimente bestätigten den Einfluss von TLR2 auf die Immunantwort und die Beteiligung an der Bildung von Granulomen (Meghari et al. 2005).

Die Interaktion von *C. b.* mit Monozyten und Makrophagen führt darüber hinaus zu einer Veränderung der Polarisierung der Wirtszellen. In ruhenden Monozyten induziert *C. b.* eine M1-Polarisierung, welche die Infektion der Erreger kontrolliert. Der M1-Typ wird durch die Simulation von IFN- γ oder durch bakterielle Produkte aufrechterhalten. Dabei werden vermehrt pro-inflammatorische Zytokine und oberflächenassoziierte Kofaktoren, wie CD80, exprimiert (Capo und Mege 2012). Bei Makrophagen induzieren Coxiellen eine M2-

Polarisierung, die mit der Sekretion von anti-inflammatorischen Mediatoren, wie IL-10, TGF- β und IL-1ra, sowie M1-typischen Faktoren, wie IL-6 und IL-8, verbunden sind. Durch die vermehrte Reduktion der Inflammation ist die Möglichkeit zur Replikation und Persistenz der Bakterien gegeben (Benoit et al. 2008a). Die Polarisation der Zelle beeinflusst somit das intrazelluläre Leben der Coxiellen (Capo und Mege 2012).

Neben Monozyten und Makrophagen werden auch DCs von Coxiellen als Wirtszelle genutzt. DCs gelten als immunologische Sentinels, die Pathogene entdecken und das Immunsystem entsprechend lenken (Steinman und Banchereau 2007). Während einer *C. b.*-Infektion sind die phagozytierenden DCs die ersten Zellen, mit denen die Bakterien in Kontakt kommen. Phase I-Partikel replizieren in humanen DC, jedoch ohne eine Aktivierung und Reifung der Zelle zu induzieren. Phase II-Partikel dagegen führen zu einer Reifung der DCs und zu einer vermehrten Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (Shannon et al. 2005b). Die fehlende Reifung der Zellen steht in einem Widerspruch zur Th1-Polarisation während eines akuten Q-Fiebers. Somit scheinen neben der DC-Aktivierung auch andere Faktoren einen Einfluss auf die Polarisation der Th-Zellen zu haben (Capo und Mege 2012).

3.5.2 Adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem spielt eine essentielle Rolle in der Heilung einer *C. b.*-induzierten Erkrankung, was bereits in zahlreichen Tiermodellen beschrieben werden konnte. So erliegen SCID-Mäuse, welche eine defiziente adaptive Immunantwort besitzen, der *C. b.*-Infektion. Immunkompetente Mäuse können dagegen die Infektion eindämmen und überleben (Andoh et al. 2003). Eine zellvermittelte Immunität sowie die Bildung von Granulomen wurden bei Patienten mit einem akuten Q-Fieber nachgewiesen. Nach Aufnahme der Bakterien durch APZs kommt es zu einer pathogenspezifischen Antigenpräsentation auf der Oberfläche der Zellen. In Kombination mit kostimulierenden Faktoren folgt eine Mobilisierung von aktivierten T-Zellen zum Infektionsort, wo diese vermehrt pro-inflammatorische Zytokine (IFN- γ , TNF- α) exprimieren. Die T-Zell-assoziierte Sekretion von Zytokinen und Chemokinen lockt andere mononukleare Zellen an, die nach Migration zur Bildung von Granulomen führen (Shannon und Heinzen 2009). Die Kombination aus IFN- γ und Granulomen resultiert aus einer Th1-polarisierten Immunantwort (Capo und Mege 2012). Die T-Zell-vermittelte Immunantwort führt jedoch nicht zur vollständigen Beseitigung der Bakterien. Infizierte Tiere scheiden die Bakterien persistent über einen langen Zeitraum nach der Primärinfektion aus (Maurin und Raoult 1999). In Patienten mit einem akuten Q-Fieber konnte noch nach Monaten bis Jahren bakterielle DNA in zirkulierenden Monozyten sowie im Knochenmark nachgewiesen werden (Harris et al. 2000). Die antimikrobiellen Mechanismen zur Eindämmung einer *C. b.*-Infektion verlaufen unabhängig von der Aktivität von reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROI). Die Wirkung von ROI auf *C. b.* ist bis heute nicht vollständig geklärt

Einleitung

(Capo und Mege 2012). IFN- γ ist ebenfalls ein wichtiges Zytokin in der Abwehr von Pathogenen (Schroder et al. 2004). In Abhängigkeit von TNF induziert IFN- γ in *C. b.*-infizierten Makrophagen die Apoptose. IFN- γ reguliert damit gleichzeitig die Expression von TNF und erhöht die Konzentration an membrangebundenen TNF-alpha, welches eine Vorstufe von zirkulierendem TNF darstellt. Der Einsatz von neutralisierenden TNF-Antikörpern verhindert die IFN- γ induzierte Eradikation der Bakterien (Dellacasagrande et al. 1999). Zusätzlich zu membran-gebundenem TNF ist eine Adhärenz von *C. b.* an β 2-Integrin und CD54 notwendig, um die IFN- γ gesteuerte Eliminierung der Bakterien durch Apoptose der befallenen Wirtszelle zu erreichen (Dellacasagrande et al. 2002). Dies zeigt, dass die zelluläre Immunantwort essentiell für die Kontrolle einer akuten Q-Fieber-Infektion ist (Shannon und Heinzen 2009). Eine chronische Infektion ist dagegen durch eine reduzierte zellvermittelte Immunantwort gekennzeichnet (Capo und Mege 2012). In Patienten mit einem chronischen Q-Fieber konnte keine Proliferation der Lymphozyten nach Kontakt mit einem *C. b.*-Antigen nachgewiesen werden. Bei PBMC von akuten Q-Fieber-Fällen wurde dagegen eine starke Reaktion auf das bakterielle Antigen mit einer erhöhten Proliferationsrate festgestellt (Koster et al. 1985b). Die Unempfindlichkeit der Lymphozyten auf *C. b.* konnte zudem bei Endokarditis-Patienten mit einer Lymphopenie der CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Sabatier et al. 1997). Diese Suppression der zellulären Immunantwort während eines chronischen Q-Fiebers wird durch eine Überproduktion anti-inflammatorischer Immunmediatoren, wie Prostaglandin (Koster et al. 1985a) oder IL-10 (Capo et al. 1996), gelenkt. Die gesteigerte Expression von IL-10 durch Makrophagen fördert die Persistenz von *C. b.* in Mäusen und reduziert die Bildung von Granulomen (Meghari et al. 2008). IL-10 begünstigt zudem die Replikation von *C. b.* in Monozyten durch die Inhibierung der TNF- α -Expression und reduziert damit die bakterielle Eliminierung durch phagozytierende Zellen (Ghigo et al. 2001). In *C. b.*-infizierten trächtigen Ziegen führte Progesteron zu einer Reduktion der pro-inflammatorische Immunantwort, welche erst nach der Geburt mit einer erhöhten Expression von TNF- α sowie IL-1 β wiederaufgehoben wurde. Die infizierten Tiere reagierten ähnlich wie persistent infizierte Mäuse oder Menschen (Roest et al. 2013). *Peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) von infizierten trächtigen Ziegen wiesen zudem eine robuste pro-inflammatorische Immunantwort gegen *C. b.* auf, jedoch ohne die Bakterien aus den Organismus zu eliminieren (Ammerdorffer et al. 2014).

4 Zielstellung

C. b. ist der Erreger der ubiquitär verbreiteten Zoonose Q-Fieber. Die primäre Quelle für eine Übertragung der Bakterien auf den Menschen stellen Wiederkäuer dar (Maurin und Raoult 1999). Über die Fähigkeit hinaus dem Erreger die Möglichkeit zur massiven Vermehrung zu geben, ist die Art der Interaktion von Coxiellen mit Wiederkäuern weitgehend unerforscht. Entsprechende Untersuchungen zur Wirt-Pathogen-Interaktion erfordern ein geeignetes Modell. Infektionsstudien mit Ziegen gaben einen ersten Einblick in den Ablauf der bakteriellen Infektion und die Immunantwort des Wirtes (Roest et al. 2012, Ammerdorffer et al. 2014). Der Aufwand einen Tierversuch unter Bedingungen der Schutzstufe 3 durchzuführen, ist sehr hoch. Zellkulturmodelle für *In vitro*-Untersuchungen mit *C. b.* wurden bereits mit verschiedenen murinen und humanen Zelltypen (Monozyten, Makrophagen, Epithelzellen) etabliert, jedoch sind diese ungeeignet die Adaptation an bzw. die Virulenz der Erreger für den natürlichen Wirt widerzuspiegeln. Somit war das Ziel dieser Arbeit ein *In vitro*-Infektionsmodell für Wiederkäuer zu etablieren. Da mononukleare Zellen, wie Monozyten und Makrophagen, zu den Zielzellen der Coxiellen zählen (Maurin und Raoult 1999), wurde das Modell an bovinen MDM etabliert. Zur Abschätzung von organ- bzw. wirtsspezies-spezifischer Besonderheiten wurden zudem bovine Alveolarmakrophagen und humane MDM verwendet. Beide Zelltypen sind in der Literatur als geeignete Modelle für *C. b.* beschrieben worden (Marriott und Dockrell 2007, Shannon und Heinzen 2008). Ob sich bovine MDM als Modell eignen, sollte anhand der Infizierbarkeit der Zellen und der *C. b.*-induzierten Wirtszellantwort geprüft werden. Daraus abgeleitete Parameter sollten eine typische Infektion in bovinen Makrophagen definieren. Um stamm- und speziesspezifische Unterschiede zu ermitteln, wurden sowohl bovine als auch humane MDM mit 13 heterogenen *C. b.*-Stämmen inokuliert und die Wirt-Pathogen-Interaktion untersucht. Aus *In vivo*-Studien ist bereits bekannt, dass Zusammenhänge zwischen bakteriellen Eigenschaften (Genotyp, LPS-Phasentyp, Herkunft) und der Pathogenese von *C. b.* in Nagern bestehen (Beare 2012, Russell-Lodrigue et al. 2009). Deshalb sollte der Einfluss verschiedener *C. b.*-Stämme auf die Parameter der Wirt-Pathogen-Interaktion auch mit dem Ziel analysiert werden, potentielle Biomarker abzuleiten, welche die Virulenz der Stämme in Wiederkäuern als auch deren zoonotisches Potential einschätzen.

5 Material

5.1 Organismen

5.1.1 Zellen

Für die zellbiologischen Untersuchungen wurden die nachstehenden primären Zellkulturen und Zelllinien verwendet:

- **MDM-Zellen**

Primäre Makrophagen wurden aus peripheren Monozyten vom Rind (*Bos taurus*) und Menschen generiert. Die Gewinnung der bovinen MDM erfolgte aus dem Vollblut von Rindern des Friedrich-Loeffler-Instituts (Standort Jena) und des Agarunternehmens „Wöllmisse“ Schlöben eG, Sitz Gernewitz bei Stadtroda. Die Blutentnahmen wurden als Tierversuch der zuständigen Behörde angezeigt (Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz, Az. 22-2684-04-04-102/13 vom 04.02.2013).

Für die Isolierung der humanen MDM wurden *buffy coats* von verschiedenen Blutspendern genutzt, welche von der Blutbank des Universitätsklinikums Jena stammten. Die Verwendung des Blutes für wissenschaftliche Zwecke wurde durch die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Jena befürwortet (Bearbeitungsnummer 3058-02/11; Schreiben vom 25.07.2013).

- **Alveolarmakrophagen**

Primäre bovine Alveolarmakrophagen wurden aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von Rindern des Friedrich-Loeffler-Instituts isoliert. Die Lavage wurde im Rahmen eines anderen Tierversuches (Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz, Registriernummer 04-004/11) entnommen und zur Verfügung gestellt.

BGM-Zellen (*Buffalo-Green-Monkey-kidney*)

Bei den verwendeten BGM-Zellen handelt es sich um eine permanente, adhärente und Fibroblasten-artige Zelllinie aus der Niere einer afrikanischen Grünen Meerkatze. Die Zellen wurden über die Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts (Insel Riems) bezogen.

5.1.2 *C. b.*-Stämme

Die Versuche wurden mit 13 verschiedenen *C. b.*-Stämmen durchgeführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Überblick über die verwendeten C. b.-Stämme. Zusammenstellung der genetischen Eigenschaften mit Typisierung der Plasmide sowie Restriktionsgruppen in Hinblick auf den Krankheitsverlauf und die Herkunft. Informationen zu den Genotypen wurden durch Dr. Carsten Heydel, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (IHT, Gießen), zur Verfügung gestellt und sind teilweise der Dissertation von Pablo Hernando Jiménez (Jiménez 2012) entnommen.

C. b.-Isolat	Stamm- Abkürzung	genetische Eigenschaften				Q-Fieber			Herkunft		Quelle
		MLVA- Gruppe	Plasmid	adaA	RFLP- PFGE	Erkrankung	Verlauf	Ursprung	Land	Jahr der Isolation	
Nine Mile RSA 493	Nml	IV	QpH1	+	I	n. b.	n. b.	Zecke	USA	1935	1
Nine Mile strain439, clone 4	NmlI	IV	QpH1	+	I	n. b.	n. b.	Zecke			1
Henzerling	H	IV	QpH1	+	I	Pneumonie	akut	Mensch	Italien	1945	1
Scurry Q217	S	II	Plasmidlos	-	V	Hepatitis	chronisch	Mensch	USA	1981	1
Dugway	D	III	QpH1	+	20	n. b.	n. b.	Nager	USA	1958	1
Z3055/91	Z3055/91	II	QpH1	+	6	n. b.	n. b.	Schaf	Dtl.	1991	1
Z69/06	Z69/06	III	QpH1	+	n. n.	n. b.	n. b.	Rind	Dtl.	2006	1
C. b. 23/2	Cb 23/2	I	QpH1	+	n. n.	n. b.	n. b.	Schaf	Dtl.	2011	2
C. b. 71/3	Cb 71/3	III	QpH1	+	n. n.	n. b.	n. b.	Ziege	Dtl.	2010	2
C. b. 98/2	Cb 98/2	III	QpH1	+	n. n.	n. b.	n. b.	Rind	Dtl.	2010	2
C. b. 19/34	Cb 19/34	I	QpH1	+	n. n.	n. b.	n. b.	Ziege	Dtl.	2010	2
C. b. 30/14	Cb 30/14	I	QpH1	+	n. n.	n. b.	n. b.	Schaf	Dtl.	2011	2
Z3464/92	Z3464/92	I	QpH1	+	4	Abort	n. b.	Ziege	Dtl.	1992	1

n. b. ... nicht bekannt

n. n. ... nicht nachgewiesen

Dtl ... Deutschland

1 ... Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität, Gießen

2 ... Stammsammlung Nationales Referenzlabor für Q-Fieber, Friedrich Loeffler Institut, Jena

5.2 Chemikalien/Medien

Tabelle 2: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-β-Mercaptoethanol	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Accutase	Sigma Aldrich® Co. LLC.
Acrylamid (30 %)	AppliChem
Ammoniumchlorid	Merck-Gruppe
Amphotericin B	Sigma Aldrich® Co. LLC.
BCIP	Sigma Aldrich® Co. LLC.
Borsäure	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Bromphenolblau	AppliChem
BSA	Serva Electrophoresis GmbH
DABCO®33-LV	Sigma Aldrich® Co. LLC.
DMEM	Gibco®
EDTA	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Essigsäure	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Ethanol	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Ethidiumbromid	Serva Electrophoresis GmbH
FKS	Gibco®
Formamid	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Fuchsin	AppliChem
Glucose	Difco
Glutaraldehyd (25 %)	Merck-Gruppe
Glycerin	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Glycin	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Harnstoff	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Humanes Serum Si070 Lot : 070M0613	Sigma Aldrich® Co. LLC
IMDM ohne Phenolrot	Gibco®
Isopropanol	Walter CMP
Kaliumchlorid	Merck-Gruppe
KH ₂ PO ₄	Merck-Gruppe
Long Ranger Gel Solution	Cambrex
LSM	PAA Laboratories GmbH
Magermilchpulver	Saliter
Malachitgrün	Fluka (Sigma Aldrich® Co. LLC.)

Material

Tabelle 2: Chemikalien (Fortsetzung)

Bezeichnung	Hersteller
Methanol	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	Sigma Aldrich® Co. LLC.
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Na-Cacodylat	Carl Roth® GmbH+Co. KG
NaH ₂ PO ₄	Merck-Gruppe
Natriumchlorid	Laborchemie Apolda
Natrium-Citrat	AppliChem GmbH
Neufuchsin	Merck-Gruppe
NPT	Serva Electrophoresis GmbH
Penicillin (1.000 IE/ml)/ Streptomycin (1.000 IE/ml)-Lösung	Sigma Aldrich® Co. LLC.
Phenolrot-Na-Salz	Biochrom
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega
Roti®-Phenol	Carl Roth® GmbH+Co. KG
RPMI	Lonza Group A
Salzsäure	Merck-Gruppe
SDS	Carl Roth® GmbH+Co. KG
TMB-Substratlösung	AbD Serotec (Bio-Rad Laboratories, Inc.)
Tris	Carl Roth® GmbH+Co. KG
Trypanblau	Sigma Aldrich® Co. LLC.
Trypsin	Serva Electrophoresis GmbH
Tween 20	Ferak Berlin

5.3 Oligonukleotide und Primer

Die in Tabelle 3 aufgeführten Oligonukleotide und *primer* wurden von Jena Bioscience GmbH synthetisiert.

Tabelle 3: Primer für die Quantifizierung der Genexpression in Makrophagen. Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung dargestellt.

Bezeichnung	Spezifität	Sequenz	Referenz
GAPDH	bo	F: GCG ATA CTC ACT CTT CTA CCT TCG A	(Taubert et al. 2006)
		R: TCG TAC CAG GAA ATG AGC TTG AC	
GAPDH	hu	F: TGG GTG TGA ACC ATG AGA AG	(Brink et al. 2000)
		R: GCT AAG CAG TTG GTG GTG C	

Material

Tabelle 3: Primer für die Quantifizierung der Genexpression in Makrophagen. Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung dargestellt. (Fortsetzung).

Bezeichnung	Spezifität	Sequenz	Referenz
IL-10	bo	F: GTG ATG CCA CAG GCT GAG AA R: TGC TCT TGT TTT CGC AGG GCA	(Lahouassa et al. 2007)
IL-10	hu	F: GTG ATG CCC CAA GCT GAG A R: CAC GGC CTT GCT GTT GTT TT	K. Sobotta
IL-12 p40	bo, hu	F: GCA GCT TCT TCA TCA GGG ACA T R: CCT CCA CCT GCC GAG AAT T	(Behrendt et al. 2008)
IL-1 β	bo	F: ACC TGA ACC CAT CAA CGA AAT G R: TAG GGT CAT CAG CCT CAA ATA ACA	(Taraktsoglou et al. 2011)
IL-1 β	hu	F: TGA TGG CTT ATT ACA GTG GCA ATG R: GTA GTG GTG GTG GGA GAT TCG	(Naldini et al. 2006)
IL-8	bo	F: CAC TGT GAA AAA TTC AGA AAT CAT TGT TA R: CTT CAC CAA ATA CCT GCA CAA CCT TC	(Leutenegger et al. 2000)
IL-8	hu	F: TCC TGA TTT CTG CAG CTC TGT R: AAT TTC TGT GTT GGC GCA GT	K. Sobotta
INF- γ	bo	F: TTC TTG AAC GGC AGC TCT GAG R: TGG CGA CAG GTC ATT CAT CA	(Budhia et al. 2006)
INF- γ	hu	F: CCA ACG CAA AGC AAT ACA TGA R: CCT TTT TCG CTT CCC TGT TTT	(Body-Malapel et al. 2008)
iNOS1/2	bo	F: GGA GTT TTC CCA TGC AAC CA R: ATC CTT GAC CCA ATA GCT GCC	K. Sobotta
iNOS1/2	hu	F: CAA CAA ATT CAG GTA CGC TGT R: GAT CAA TGT CAT GAG CAA AGG	K. Sobotta
MCP-1	bo	F: GCT GTG ATT TTC AAG ACC ATC CT R: GGC GTC CTG GAC CCA TTT	(Sow et al. 2009)
MCP-1	hu	F: GTG CAG AGG CTC GCG AGC TA R: CAG GTG GTC CAT GGA ATC CTG	(Glushakova et al. 2008)
RANTES	bo	F: CAT GGC AGC AGT TGT CTT TAT CA R: CTC TCG CAC CCA CTT CTT CTC T	(Taraktsoglou et al. 2011)
RANTES	hu	F: AAC CCA GCA GTC GTC TTT GTC A R: CTC CCG AAC CCA TTT CTT CTC T	(Hu et al. 1999)
TGF- β	bo, hu	F: GGC CCT GCC CTT ACA TCT G R: CGG GTT GTG CTG GTT GTA CA	(Moussay et al. 2006)
TNF- α	bo	F: TCT TCT CAA GCC TCA AGT AAC AAG T R: CCA TGA GGG CAT TGG CAT AC	(Leutenegger et al. 2000)
TNF- α	hu	F: TCT TCT CGA ACC CCG AGT GA R: CCT CTG ATG GCA CCA CCA G	K. Sobotta

Material

Tabelle 4: Primer für die Quantifizierung von *C. b.* Sequenzen sind in 5`-3`Orientierung dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz 5`-3`	Referenz
Icd-439 _F	F: GTC TTA AGG TGG GCT GCG TG	(Klee et al. 2006)
Icd-464 _{TM}	6FAM-AGCGAACCATTGGTATCGGACGTTXTATGG--PH	(Klee et al. 2006)
Icd-514 _R	R: CCC CGA ATC TCA TTG ATC AGC	(Klee et al. 2006)

Tabelle 5: Primer für die genotypische Charakterisierung der *C. b.*-Isolate. Die Sequenzen sind in 5`-3`Orientierung dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz 5`-3`
<i>adaA</i>	F: TCA CCG CTG TTT TTT CAG ACG R: AAT AGA TTC GCT CTC TCA AGC CG
Cox1	F*: AGA AAA AAG CAC AGA CCT TGA R: TTC CTG ATT TAA AAG GGT GAC T
Cox2	F*: TTC TTT ATT TCA GGC CGG AGT R: CCG GTA ACG CCG ATT AGT AA
Cox3	F*: GCA ATC CAG TTG GAA AGA A R: ATT GAA GTA ATC CAT CGT GAT T
Cox4	F*: ATG AAG AAA GGA TGG AGG G R: TGC AAG GAT AGC CT
Cox5	F*: AAT GGA GTT TGT TAG CAA AGA AA R: AAA GAC AAG CAA AAC GAT AAA AA
Cox6	F*: GAC AAA AAT CAA TAG CCC GT R: GAG TTG TGT GGC TTC GC
Cox7	F*: ACA GGC CGG TAT TCT AAC C R: CCT CAG CAC CCA TTC AG
QpDV	F: TTC TTA GTA ACC GGT AGT GGA TGT CC R: GGC TGT TGT GCA TAT TAG TGT GAT G
QpH1	F: GCG AGT TGA GGC AGA AGA GG R: GCA CGG TAG AAT GGA AGG AAG
QpRS	F: CTT TCT AAT GGG ATT CCG TCA GC R: AGT ATT CAA TTA AGG ACA CCC GTC A
Scurry	F: GCA TGC TCC ATA GCC AAC GTA ATC T R: TGC AAT TCT GTT GTT ATC AGT GCC TT
TRANS	1: TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C 2: CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC

* Primer am 5`-Ende mit DY-781 markiert

5.4 Kommerzielle Testsysteme

Tabelle 6: Kommerziell erhältliche Testsysteme und gebrauchsfertige Produkte

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
6 x DNA Loading Dye	Fermentas	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
Fertiggel nUView (4-20 % Tris/Glycin-Gel, 10x10 cm)	Peqlab Biotechnologie GmbH	SDS-Gelelektrophorese
Gene Ruler™ 100 bp Ladder	Fermentas	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
Haema Diff Quick	Labor und Technik, Eberhard Lehmann GmbH	Zellzahlbestimmung humane Makrophagen
Multiplex PCR Kit	Qiagen	Plasmid-Multiplex-PCR, <i>adaA</i> -PCR, MLVA-PCR
Omniscript RT Kit	Qiagen	Reverse Transkription
PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder	Thermo Scientific	SDS-Gelelektrophorese
PageSilver Silver Staining Kit	Fermentas	Silberfärbung
RNase-Free DNase-Set	Qiagen	RNA-Isolierung
RNeasy Mini Kit	Qiagen	RNA-Isolierung
Roti-Black P Silver Staining Kit	Carl Roth® GmbH+Co. KG	Silberfärbung
Rotiphenol	Carl Roth® GmbH+Co. KG	LPS-Isolierung
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystem	<i>real-time</i> PCR

5.5 Antikörper

Tabelle 7: Primär-Antikörper für Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzmikroskopie. Gegen humane Antigene gerichtete Antikörper sind direkt-markiert.

Antigen (konjugierter Farbstoff)	Zelllinie	Isotyp	Spezifität	Hersteller	Verdünnung
CD4	GC1A	IgG2a	bo	VMRD, USA	1:500
CD8	MCA837G	IgG2a	bo	AbDSeroTec, UK	1:500
CD11b	MM10A	IgG1	bo	VMRD, USA	1:250
CD14	CAM36A	IgG1	bo	VMRD, USA	1:500
CD21	GB25A	IgG1	bo	VMRD, USA	1:500
CD40	Aszites	IgG1	bo	Prof. Werling, UK	1:10
CD40 (FITC)	5C3	IgG1k	hu	Becton Dickinson	1:222
CD80	Aszites	IgG1	bo	Prof. Werling, UK	1:10
CD80 (FITC)	MEM-233	IgG1	hu	Biozol	1:222
CD86	Aszites	IgG1	bo	Prof. Werling, UK	1:10

Material

Tabelle 8: Primär-Antikörper für Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzmikroskopie (Fortsetzung).

Antigen (konjugierter Farbstoff)	Zelllinie	Isotyp	Spezifität	Hersteller	Verdünnung
CD86 (FITC)	BU63	IgG1	hu	Biozol	1:222
MHCI	PT85A	IgG2a	bo	VMRD, USA	1:500
MHCI (FITC)	G46-2.6	IgG1k	hu	Becton Dickinson	1:400
MHCII	H34A	IgG2b	bo	VMRD, USA	1:500
MHCII (R-PE)	423L	IgG2a	hu	Biozol	1:400
TCR1-N24 (δ-Kette)	GB21A	IgG2b	bo	VMRD, USA	1:500

Tabelle 9: Sekundär-Antikörper für Durchflusszytometrie

Spezifität	Fluorochrom	Hersteller	Verdünnung
IgG1	Allophycocyanin	Southern Biotech, USA	1:1.000
IgG2a	Allophycocyanin	Southern Biotech, USA	1:1.000
IgG2b	R-Phycoerythrin	Southern Biotech, USA	1:1.000

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für ELISA und Westernblot

Antikörper	Klon	Hersteller
Goat Anti Rabbit IgG: HRP	AHP423	AbDSerotec
Mouse Anti Sheep Interleukin 1 beta	MCA1658	AbDSerotec
Rabbit Anti Sheep Interleukin 1 beta	STAR124P	AbDSerotec
Anti-Mouse IgG-AP		Boehringer Mannheim GmbH

5.6 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

5.6.1 Puffer, Lösungen und Medien für Zellkulturtechniken

Cacodylat-Puffer

Na-Cacodylat 21,4 g
A. dest. ad 1000 ml
 pH 7,2-7,4

Citratlösung (3,8 %)

Na₃-Citrat 38,0 g
A. dest. ad 1000 ml

DMEM

DMEM 450 ml
 FKS (10 %) 50 ml

Material

Erythrozyten-Lyse-Puffer

NH ₄ Cl	8,29 g
NaHCO ₃	1,09 g
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	0,037 g
A. dest.	ad 1000 ml

FKS

FKS für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert

Glutaraldehyd (2,5 %) mit Glucose

Glutaraldehyd (2,5 %)	100 ml
Glucose	1,8 g

Glutaraldehyd 2,5 %

Glutaraldehyd (25 %)	10 ml
Cacodylat-Puffer	90 ml

IMDM-Beutel-Medium (bovine MDM)

IMDM ohne Phenolrot	390 ml
Penicillin (1000 IE/ml)/ Streptomycin (1000 IE/ml)-Lösung	5 ml
Amphotericin B	5 ml
FKS (20 %)	100 ml
2-β-Mercaptoethanol (100 μM)	250 μl

IMDM-Kulturmedium (bovine Makrophagen)

IMDM ohne Phenolrot	480 ml
Penicillin (1000 IE/ml)/ Streptomycin (1000 IE/ml)-Lösung	5 ml
Amphotericin B	5 ml
FKS (2 %)	10 ml
2-β-Mercaptoethanol (100 μM)	250 μl

IMDM-Kulturmedium ohne Antibiotika (bovine Makrophagen)

IMDM ohne Phenolrot	490 ml
FKS (2 %)	10 ml
2-β-Mercaptoethanol (100 μM)	10 μl

Natriumchloridlösung (0,89 %)

NaCl	8,9 g
A. dest.	ad 1.000 ml

PBS-EDTA-Puffer (10 x, pH 7,4)

Na ₂ HPO ₄	14,2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
KCl	2 g
NaCl	80 g
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	20 g
A. dest.	ad 1.000 ml

RPMI-Kulturmedium (humane MDM)

RPMI ohne Phenolrot	464 ml
Penicillin (1000 IE/ml)/ Streptomycin (1000 IE/ml)-Lösung	1 ml
FKS (5 %)	25 ml
Humanes Serum Si070 (2 %)	10 ml

RPMI-Kulturmedium ohne Antibiotika (humane MDM)

RPMI ohne Phenolrot	465 ml
FKS (5 %)	25 ml
Humanes Serum Si070 (2 %)	10 ml

Material

WMoA 5 % (BGM-Medium Gießen)

MEM mit Earle's salts	500 ml
NaHCO ₃	0,425 g
Vitamin 100 x	5 ml
L-Glutamin	5 ml
FKS	25 ml

5.6.2 Lösungen und Puffer für bakteriologische Arbeiten

Karbofuchsin Gebrauchslösung

Karbofuchsin-Stammlösung	3 ml
Na-Phosphat Puffer (0,1 M)	5 ml
→ vor Gebrauch frisch filtrieren, nicht länger als 40 h aufbewahren	

Karbofuchsin Stammlösung

Neufuchsin (10 %)	100 ml
wässriges Phenol (4 %)	250 ml
A. dest.	650 ml
→ 48 h bei 37 °C inkubieren lassen, Lagerung bei 4 °C	

Laufpuffer SDS-Page

Tris-Base	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
A. dest.	ad 1000 ml

Malachitgrün-Gebrauchslösung

wässrige Malachitgrünlösung	0,8 %
-----------------------------	-------

Na-Phosphat-Puffer (0,1 M)

NaH ₂ PO ₄ (0,2 M)	3,5 ml
Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)	15,5 ml
A. dest.	19 ml
→ auf pH 7,45 einstellen	

Probenpuffer nach Laemmli

1 M Tris-Cl (pH 6,8)	0,5 ml
SDS (10 %)	2 ml
Bromphenolblau	0,01 g
Glycerin (10 %)	1 ml
A. dest.	ad 10 ml

Trypsin/Versen-Puffer

Trypsin Fertiglösung von Biochrom	10 ml
Versen Puffer	90 ml
→ Lagerung bei -20 °C	

Versen-Puffer

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,4536 g
EDTA	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Phenolrot-Na-Salz	0,015 g
A. dest.	ad 1.000 ml
→ Lagerung bei 4 °C	

Material

WMOA

MEM mit Earle`s salts	500 ml
NaHCO ₃	0,425 g
Vitamine 100x	5 ml
L-Glutamine	5 ml
FKS (5 %)	25 ml

5.6.3 Puffer für molekularbiologische Arbeiten

10 x TBE-Puffer für LI-COR

Tris	107,82 g
Borsäure	55 g
EDTA	7,4 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml
→ pH auf 8,3 mit 5 N NaOH einstellen	

50 x TAE

Tris	242 g
Eisessig	57,1 g
EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml
→ vor Gebrauch 1:50 mit <i>A. dest.</i> verdünnen	

LI-COR Auftragspuffer (Gebrauchslösung)

Formamid	14,4 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,3)	600 µl
LI-COR Auftragspuffer (Stammlösung)	1 ml

LI-COR Auftragspuffer (Stammlösung)

Formamid	12,5 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,3)	0,5 ml
Fuchsin	78 mg

5.6.4 Puffer für immunologische Techniken

Alkalischer Phosphatase-Puffer (pH 9,2)

NaCl (100 mM)	5,8 g
Tris (100 mM)	12,1 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000ml

BCIP-Stammlösung

5 % BCIP in DMF lösen
→ Lagerung bei < -15 °C

Beschichtungspuffer (pH 9,5-9,8)

Na ₂ CO ₃ x 10 H ₂ O	2,15 g
NaHCO ₃	1,45 g
<i>A. dest.</i>	500 ml

Blockierungslösung

Magermilchpulver (3 %)	0,3 g
PBS-Tween	ad 10 ml
→ frisch ansetzen	

Material

Blockpuffer

1x PBS	100 ml
BSA (0,5 %)	0,5 g

ELISA-Waschpuffer

1 x PBS	2000 ml
Tween 20 (0,05 %)	1 ml

FACS-Waschpuffer (WP)

PBS (1 x)	99,5 ml
FKS (0,5 %)	500 µl

Immun-Färbelösung

Alkalischer Phosphatase-Puffer	5 ml
BCIP-Stammlösung	16,5 µl
NBT-Stammlösung	33 µl
→ frisch ansetzen	

Laemmli-Puffer (2 x)

Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	1 ml
Glycerol (87 %)	0,92 ml
SDS (10 %)	1,6 ml
2-β-Mercaptoethanol	0,4 ml
Bromphenolblau (0,05 %)	0,2 ml
<i>A. dest</i>	4 ml

NBT-Stammlösung

5 % NBT in einem Gemisch aus 70 % Dimethylformamid und 30 % *A. dest* lösen
→ Lagerung bei < -15 °C

PBS-Puffer (10 x, pH 7,4)

NaCl	10 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
KCl	2,5 g
NaHPO ₄ x 2 H ₂ O	18 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

PBS-Tween

PBS (1 x)	1000 ml
Tween 20 (0,05 %)	500 µl

Reagenzienverdünnungspuffer

1x Waschpuffer	100 ml
BSA (0,5%)	0,5 g

Transferpuffer (pH 8.3)

Glycin (193 mM)	14,49 g
Tris basisch (25 mM)	3,03 g
Methanol (20 %)	200 ml
<i>A dest</i>	ad 1000 ml
→ kühl lagern	

6 Methoden

6.1 Zellbiologische Methoden

6.1.1 Zellkultur

Die Kultivierung der einzelnen Zellen erfolgte im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % in den jeweiligen Kulturmedien. Nur die immortalisierte Zelllinie BGM wurde passagiert. Dazu wurden die adhären wachsenden Zellen mittels Trypsin oder eines Zellschabers von der Gefäßoberfläche abgelöst, in frischem Kulturmedium vereinzelt und je nach Bedarf ein Teil verworfen oder frisch ausgesät.

6.1.2 Präparation von bovinen MDM aus dem Blut

Die Isolation und Kultivierung von bovinen MDM folgte nach einem beschriebenen Protokoll (Loos 2012).

6.1.2.1 Isolierung der PBMC

Von klinisch gesunden Rindern wurden jeweils 500 ml Vollblut aus der *Vena jugularis* entnommen und in eine Glasflasche überführt, in der 3,8 %iges Natrium-Citrat (1/5 des Blutvolumens) zur Hemmung der Blutgerinnung vorgelegt wurde. Das Volumen des entnommenen Blutes richtete sich nach dem Gewicht der Tiere. Nach dem Transport ins Labor wurden jeweils 40 ml des Citrat-Blutes in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (2380 x g, 20 min, RT, ungebremster Auslauf). Anschließend wurde etwa 1/3 des Blutplasmas entfernt, der *buffy coat* vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und zusammen mit dem *buffy coat* aus einem weiteren Röhrchen mit dem Blut des gleichen Tieres in einem frischen 50 ml-Zentrifugenröhrchen vereinigt. Bei der Entnahme wurden so wenig Erythrozyten wie möglich mit aufgenommen. Die Röhrchen wurden mit PBS/EDTA auf 45 ml aufgefüllt, langsam geschwenkt und zentrifugiert (800 x g, 10 min, RT, ungebremster Auslauf). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das verbleibende Probenvolumen auf 45 ml mit PBS/EDTA aufgefüllt und zentrifugiert (800 x g, 10 min, RT, ungebremster Auslauf). Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 45 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und 10 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschrift (300 x g, 10 min, RT, abgebremster Auslauf). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 45 ml PBS/EDTA resuspendiert und zentrifugiert (300 x g, 10 min, RT, ab-

Methoden

gebremster Auslauf). Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Pellet in 25 ml PBS/EDTA aufgenommen und vorsichtig auf 20 ml Lymphozytenseparationsmedium (LSM) geschichtet. Nach einer Dichtegradientenzentrifugation (800 x g, 45 min, RT, ungebremster Auslauf) wurde die Interphase, in der sich die PBMC gesammelt hatten, abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit 0,89 %iger NaCl-Lösung. Im ersten Schritt wurden die Zellen bei 600 x g, 8 min, RT und abgebremsten Auslauf zentrifugiert, in den weiteren Schritten jeweils bei 300 x g, 10 min mit abgebremstem Auslauf. Bei jedem Waschschrift wurde nach der Zentrifugation der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml 0,89 % NaCl-Lösung resuspendiert, zwei Röhrchen vereinigt und mit 0,89 % NaCl-Lösung auf 45 ml aufgefüllt. Nach dem letzten Schritt wurde das Pellet in 10 bis 15 ml 0,89 % NaCl-Lösung resuspendiert und ein Aliquot für die Zellzahlbestimmung abgenommen. Während des letzten Zentrifugationsschrittes (300 x g, 10 min, abgebremster Auslauf) wurde das Aliquot mit Trypanblau-Lösung in einem Verhältnis von 1:20 versetzt und die Zellzahl in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Schließlich wurde das Pellet in IMDM-Anzucht-Medium aufgenommen und die Zellsuspension auf eine Zellzahl von 4×10^6 Zellen/ml eingestellt.

6.1.2.2 Generierung boviner MDM-Kulturen

Mit einer 30 ml Spritze wurden je 25 ml der eingestellten Zellsuspension in einen Teflonbeutel überführt. Nach dem Verschließen der Beutel wurden diese mit 70 %iger Isopropanol-Lösung abgewischt und für 7 Tage im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Zur Ernte der Zellen wurden die Beutel zunächst für 20 min bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und dann von beiden Seiten mit den Fingern beklopft, um die angeheftete MDM von der Oberfläche zu lösen. Mit Hilfe einer 60 ml-Spritze wurde die Zellsuspension aus dem Beutel durch mehrfaches Absaugen bzw. Zurückspritzen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Beutel zweimal mit eiskalter 0,89 %igen NaCl-Lösung gewaschen. Die Spüllösung wurde ebenfalls in das Röhrchen gegeben. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (300 x g, 10 min; RT; gebremster Auslauf). Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 45 ml 0,89 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. Bei der Ernte mehrerer Beutel wurden zwei Zellpellets nach jedem Zentrifugationsschritt (300 x g, 10 min; RT; gebremster Auslauf) vereinigt und anschließend mit 45 ml 0,89 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 2 bis 5 ml IMDM-Kulturmedium aufgenommen. Für die Bestimmung der Zellzahl in einer Zählkammer nach Neubauer wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen, mit Trypanblau-Lösung in einer 1:20-Verdünnung versetzt und ausschließlich die im Vergleich zu den Lymphozyten größeren, granulierten MDM gezählt. Die MDM wurden anschließend in Polystyrolröhrchen in einer Dichte von 5×10^5 MDM/ml oder in unbeschichteten Zellkultur-

Methoden

platten mit 6 Vertiefungen in einer Dichte von 2×10^6 MDM/3 ml bzw. mit 24 Vertiefungen in einer Dichte von 5×10^5 MDM/ml ausgesät und zum Adhärenieren für 18 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die nicht adhärenenten Lymphozyten mit 0,89 %iger NaCl-Lösung abgespült und frisches IMDM-Kulturmedium zu den MDM-Kulturen hinzugegeben.

6.1.3 Generierung humaner MDM-Kulturen

Für die Monozyten-Isolierung aus humanem peripherem Blut wurden *buffy coats* verwendet, welche durch das Universitätsklinikum Jena (Institut für Transfusionsmedizin) zur Verfügung gestellt wurden. Jeweils 40 ml *buffy coat* wurden mit 40 ml PBS vermischt und vorsichtig auf 20 ml LSM aufgeschichtet. Nach einem Zentrifugationsschritt ($250 \times g$, 45 min, ungebremster Auslauf) bildeten sich 3 Phasen aus. Die mittlere, PBMC-haltige Interphase wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit PBS/EDTA auf ein Endvolumen von 40 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt ($1.000 \times g$, 25 min, ungebremster Auslauf). Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets in 10 ml PBS/EDTA resuspendiert und der Inhalt von jeweils zwei Röhrchen miteinander vereinigt. Nach Zugabe von PBS/EDTA auf 30 ml erfolgte eine weitere Zentrifugation ($340 \times g$, 25 min, ungebremster Auslauf), der sich zwei Waschschrte mit 30 ml PBS ($290 \times g$ bzw. $160 \times g$, 25 min, ungebremster Auslauf) anschlossen. Im letzten Schritt wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und für die Zellzählung in der Neubauer-Kammer 1:10 verdünnt. Pro Vertiefung wurden 2×10^7 Zellen in eine 24-Well-Zellkulturplatte gegeben. Nach 90 min Inkubation im Brutschrank (37°C , 5 % CO_2) wurde der Überstand in eine neue Vertiefung überführt und nochmals resuspendiert. Die in der ersten Vertiefung verbliebenen Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und frisches Medium hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 18 h wurde der Überstand der zweiten Aussaat abgesaugt und wie bereits beschrieben behandelt. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Sechs Tage nach der Isolation konnten die Zellen für die jeweiligen Versuche verwendet werden. Für die Zellzahlbestimmung wurden von jedem Patienten zusätzlich ausgesäte Zellen mit dem Haema Diff Quick-Schnelltest gefärbt (Durchführung nach Herstellerangaben). Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch anhand eines selbst erstellten Rasters.

6.1.4 Isolierung und Kultivierung von bovinen Alveolarmakrophagen

Die Kälber wurden nach einem bestehenden Protokoll anästhesiert und mit einem Endoskop aus dem Tracheobronchiallymphknoten die BALF lavagiert (Prohl et al. 2014). Die in PBS aufgenommenen Zellen wurden zentrifugiert ($300 \times g$, 10 min, gebremster Auslauf) und das Pellet in 1 ml IMDM-Beutel-Medium aufgenommen. Danach wurde ein Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zählkammer nach Neubauer entnommen und ausschließlich die

Methoden

granulierten Makrophagen gezählt. Anschließend wurden die Zellen mit Beutelmilchmedium entsprechend verdünnt und in Zellkulturgefäße mit 6 (2×10^6 Zellen/Vertiefung) oder 24 Vertiefungen (5×10^5 Zellen/Vertiefung) eingesät. Die Adhärenz erfolgte bei einer Inkubation von 18 h im Brutschrank. Danach wurden die Makrophagen mit 0,89%iger NaCl-Lösung gewaschen und IMDM-Kulturmedium mit Antibiotika hinzugefügt.

6.1.5 Bestimmung der Vitalität

Für die Bestimmung der Vitalität wurden die Zellen mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung für 3 min bei RT inkubiert und anschließend die Zellen lichtmikroskopisch in fünf Gesichtsfeldern ausgezählt (Altman et al. 1993). Dabei wurde die Gesamtheit der Zellen pro Gesichtsfeld erfasst und in Relation zu den blau-gefärbten toten Zellen zu den nicht angefärbten vitalen Zellen gesetzt.

6.1.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Makrophagenkulturen

Für die Beurteilung der Zellmorphologie wurden neben der lichtmikroskopischen Darstellung auch elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierfür wurden je 2×10^6 Makrophagen pro Vertiefung in einer nicht beschichteten (Suspensions-Zellkulturplatten, Greiner Bio-one: bovine MDM) oder beschichteten (Advanced TC Zellkulturplatten, Greiner Bio-one: humane MDM und bovine Alveolarmakrophagen) Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen kultiviert. Das Medium der Zellen wurde vor der Fixierung entnommen, 2 ml 2,5 %iges Glutaraldehyd hinzugefügt und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Glutaraldehyd verworfen und die Makrophagen vorsichtig mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgenommen. Die Zellen wurden dann ohne zu resuspendieren in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und bei 10.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend so weit entfernt, dass nur noch ein dünner Flüssigkeitsfilm über dem Pellet verblieb. Die Probe wurde bis zur Aufarbeitung bei 4 °C gelagert. Für die Präparierung der Zellen wurde ein großes Zellpellet benötigt. Dies wurde aus verschiedenen Makrophagenkulturen gepoolt. Für eine längere Lagerung wurden die Zellpellets in Cacodylat-Puffer gegeben. Die weitere Aufarbeitung der Proben und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten am Institut für Molekulare Pathogenese (FLI, Jena) durch Prof. Dr. Liebler-Tenorio.

6.2 Infektionsversuche in Makrophagenkulturen

Für Infektionsversuche wurden die MDM-Kulturen und die bovinen Alveolarmakrophagen ein bis zwei Tage vor der Infektion auf Antibiotikum-freies IMDM-Kulturmedium umgestellt. Alle Arbeiten mit dem Erreger, ausgenommen Stamm NmII, erfolgten bis zur Inaktivierung des biologischen Materials in einem Labor der Schutzstufe 3.

6.2.1 Invasion in bovinen MDM

Um eine optimale Infektion zu erzielen, wurden Infektionsstudien zur Findung einer geeigneten MOI (*multiplicity of infection*) und Inokulationszeit mit dem Stamm Nml in bovinen MDM durchgeführt. Hierfür wurden Polystyrolröhrchen mit einer Zelldichte von 5×10^5 MDM/ml verwendet, welche mit verschiedenen MOI's (100, 200) und Inokulationszeiten (1 h, 2 h, 24 h) behandelt wurden. Nach einer Inkubation von 7 d wurde die Keimzahl mit Hilfe des KID₅₀-Tests bestimmt sowie das morphologische Bild der Zellen lichtmikroskopisch beurteilt.

6.2.2 Aufzeichnung einer Replikationskinetik

Für die Aufzeichnung einer Wachstumskinetik in bovinen MDM wurden Polystyrolröhrchen mit einer Zelldichte von jeweils 5×10^5 MDM/ml verwendet. Nach der Umstellung des Mediums auf Antibiotikum-freies IMDM-Kulturmedium erfolgte am Tag der Infektion ein weiterer Mediumwechsel abzüglich des Inokulumvolumens (50 µl). Die Zellen wurden anschließend mit einer MOI von 100 für 1 h bei 37 °C inokuliert. Nach der Inkubationszeit wurde das Inokulum entfernt, die Zellen dreimal mit 1 ml 0,89 %iger NaCl-Lösung gewaschen und 1 ml frisches IMDM-Kulturmedium ohne Antibiotikumzusatz zu der MDM-Kultur hinzugefügt. Alle Ansätze wurden bis zur Probenahme im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Zeitpunkte für die Probenahme wurden anhand eines Vorversuches definiert. In diesem wurden die bovinen MDM-Kulturen mit dem Stamm Nml infiziert und die Proben nach 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 7 d, 9 d, 11 d sowie 14 d *p. i.* entnommen. Für jede Probe wurde jeweils die Lebendkeimzahl anhand eines KID₅₀-Tests (6.3.3) oder das Gen der Isocitratdehydrogenase (*icd*) mit Hilfe einer *real-time* PCR (6.4.3) in der intrazellulären Fraktion bestimmt. Hierfür wurde das Medium als extrazelluläre Fraktion in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, anschließend 1 ml frisches IMDM-Kulturmedium ohne Antibiotikumzusatz auf den Zellrasen gegeben und diese Probe als intrazelluläre Fraktion bis zur Aufarbeitung bei – 80 °C gelagert. Für den quantitativen Nachweis von *C. b.* wurde die intrazelluläre Fraktion einem dreimaligen Auftau- und Einfrierzyklus unterzogen. Bei dieser Methode werden die Zellen durch den osmotischen Druck zerstört und die Bakterien freigesetzt. Für die Bestimmung des *icd*-Gens wurde von jedem Ansatz ein Aliquot von 100 µl entnommen und hitzeinaktiviert (30 min, 95 °C). Der Rest der Probe wurde zur Quantifizierung der Lebendkeimzahl verwendet. Im Hauptversuch mit 13 *C. b.*-Stämmen wurde die Probeentnahme auf folgende Zeitpunkte eingeschränkt: 1 d, 7 d und 14 d *p. i.*. Vor jeder Probenahme wurden die Zellen lichtmikroskopisch anhand der Zellmorphologie und der Entwicklung der PV beurteilt.

Die Aufnahme der Wachstumskinetik verschiedener *C. b.*-Stämme in humanen MDM erfolgte nach dem Protokoll der bovinen MDM-Infektion. Da die Zellen ausschließlich auf speziell beschichteten Platten adhäreren, wurden spezielle Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen

Methoden

verwendet. Pro Vertiefung wurde eine Zelldichte von 8×10^5 Makrophagen eingesetzt und entsprechend infiziert. Jede Zellkulturplatte enthielt nur Proben für einen Zeitpunkt der Kinetik, sodass nach Entnahme des extrazellulären Überstands sowie Zugabe von 1 ml Kulturmedium, die Platte mit Parafilm abgedichtet und bei -80 °C gelagert werden konnte. Die intrazelluläre Infektion wurde nach einem dreimaligen Einfrier- und Auftauverfahren gewonnen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Aufarbeitung der Proben für die Quantifizierung der Bakterien erfolgte wie bei den bovinen MDM. Für die Bestimmung der Replikation von *C. b.* in bovinen Alveolarmakrophagen wurde das Protokoll gemäß der humanen MDM verwendet.

6.2.3 Bestimmung der Wirtsantwort während einer Infektion

Für die Bestimmung der Makrophagenreaktion auf eine Infektion mit *C. b.* in Form der Expression von Zytokinen und Chemokinen wurden unbeschichtete (bovine MDM) oder beschichtete (humane MDM und bovine Alveolarmakrophagen) Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen mit einer Zelldichte von 2×10^6 MDM/3 ml verwendet. Nach Umstellung des Mediums auf Antibiotikum-freies IMDM-Kulturmedium erfolgte am Tag der Infektion ein weiterer Mediumwechsel abzüglich des Inokulumvolumens. Die Zellen wurden anschließend mit verschiedenen *C. b.*-Stämmen (MOI = 100) für 1 h bei 37 °C infiziert. Als Kontrollen wurden zusätzlich eine Mock-Infektion mit gleichem Volumina an NaCl-Lösung sowie als Positivkontrollen eine Stimulation mit *E. coli* LPS O111:B4 ($6\text{ }\mu\text{g/ml}$) und eine hitzeinaktivierte Suspension des Stammes Nml (30 min bei 95 °C) verwendet. Nach der Inkubationszeit wurde das Inokulum entfernt, die Zellen dreimal mit 3 ml 0,89 %iger NaCl-Lösung gewaschen und 3 ml frisches IMDM-Kulturmedium ohne Antibiotikum-Zusatz zu den Kulturen hinzugefügt. Das LPS der Positivkontrolle wurde hingegen nicht über den Inkubationszeitraum entfernt. Alle Ansätze wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Bei Versuchen mit bovinen MDM wurden Proben für eine Auswahl an Referenzstämmen nach einer Inkubation von 3 h, 1 d, 3 d und 7 d *p. i.* entnommen. Für die vergleichenden Untersuchungen zwischen den einzelnen Stämmen und den Zellkulturen erfolgte die Probenahme 3 h *p. i.* Hierfür wurden die Zellen zweimal mit 3 ml 0,89 %iger NaCl-Lösung gewaschen und mit 350 μl RLT-Puffer (RNeasy® Mini Kit, Puffer mit 1 % 14,3 M 2- β Mercaptoethanol) lysiert. Das Zelllysat wurde anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert. Der RLT-Puffer wirkt nachweislich bakteriostatisch auf *C. b.*, sodass alle weiteren Aufarbeitungsschritte außerhalb des S3-Labors stattfinden konnten.

6.2.4 Charakterisierung der Oberflächenmarker-Expression

Nicht beschichtete (bovine MDM) und beschichtete (humane MDM und bovine Alveolarmakrophagen) Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen wurden mit einer Zelldichte von

Methoden

2×10^6 MDM/3 ml eingesät. Nach Umstellung auf Antibiotikum-freies Kulturmedium erfolgte die Infektion mit 100 MOI für 1 h bei 37 °C. Als Negativkontrolle wurde eine Mock-Infektion, sowie als Positivkontrolle LPS von *E. coli* (6 µg/ml) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde das Inokulum entfernt, die Zellen dreimal mit 3 ml 0,89 %iger NaCl-Lösung gewaschen und 3 ml frisches Kulturmedium hinzugefügt. Das LPS in der Positivkontrolle wurde hingegen nicht über den Inkubationszeitraum entfernt. Alle Ansätze wurden bis zur Probennahme bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Probennahmezeitpunkt wurde zunächst in einem Vorversuch ermittelt. Hierfür wurden bovine MDM mit Nml und einer entsprechenden hitzeinaktivierten Nml-Suspension inokuliert und die Oberflächenmoleküle CD40, CD80, CD86, MHC I sowie MHC II nach 3 h, 6 h und 24 h *p. i.* durchflusszytometrisch quantifiziert. Für die vergleichenden Untersuchungen der Expression von Aktivierungsmarkern zwischen 13 *C. b.*-Stämmen in den verschiedenen Makrophagenkulturen wurden die Proben 24 h *p. i.* entnommen und untersucht.

6.3 Bakteriologische Methoden

Die Anzucht und Typisierung der Bakterien wurden am IHIT in Gießen durchgeführt.

6.3.1 Anzucht und Aufreinigung von *C. b.*

Die verwendeten Isolate wurden nach dem Verfahren von Arens (Arens 1979) der kontinuierlichen Vermehrung in BGM-Zellen kultiviert. Für die Vermehrung wurden BGM-Zellen auf Deckgläschen in Polystyrolröhrchen, in Vierkant- oder Zellkulturflaschen angezüchtet. Der konfluente Zellrasen in den Polystyrolröhrchen wurde mit dem jeweiligen *C. b.*-Isolat inokuliert und anschließend bei 37° für 1 h bei 3.000 x *g* zentrifugiert. Nach drei bis sieben Tagen Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) und täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die infizierten Zellen mittels Ultraschall für 5 s (Sonifier B-12, Branson Sonic, 60-70 Watt) aufgeschlossen. Das entstandene Lysat diente als Inokulum für die Zellkulturen in den Vierkantflaschen. Nach einer 6-tägigen Inkubation bei 37 °C wurden die infizierten Zellen von der Oberfläche abgeschabt und für die Infektion der Zellkulturflaschen verwendet. Jeweils nach 2 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Überstände der infizierten Zellen geerntet wurden. Die gesammelten Überstände wurden bei 14.300 x *g* im Festwinkelrotor für 1 h bei 5 °C zentrifugiert und das Sediment in 5 bis 10 ml 0,89 %iger NaCl-Lösung resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt im Festwinkelrotor (39.000 x *g*, 5 °C, 45 min). In der anschließenden Ultraschallbehandlung des in 10 ml 0,89 %iger NaCl-Lösung gelösten Pellets wurden die sedimentierten Zellen aufgeschlossen. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (484 x *g*, 5 °C, 10 min), um den Zelldetritus von den Erregern zu trennen. Im Anschluss wurde der *C. b.*-haltige Überstand erneut bei 39.200 x *g* für 45 min bei 5 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl bis 1.000 µl 0,89 %iger NaCl-Lösung resuspendiert und bis

zur Quantifizierung gegebenenfalls bis zu 4 Tage bei 4 °C gelagert. Nach der Quantifizierung mit Hilfe der Gimenez-Färbung (6.3.2) wurden die *C. b.*-Suspensionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

6.3.2 Gimenez-Färbung

Ein Aliquot der zu bestimmenden *C. b.*-Suspension wurde auf einen Objektträger aufgetragen, luftgetrocknet und für 1 Stunde im Methanolbad fixiert. Anschließend folgte ein 10-minütiger Färbeschritt mit Karbolfuchsin-Gebrauchslösung bei RT und danach mit Malachitgrün (8 %; 2 x 1 min; RT). Vor und nach jedem Färbeschritt wurde der Objektträger mit *A. dest.* gewaschen. Die Auszählung der Partikel erfolgte mikroskopisch mit Hilfe eines Okularzählgitters (Netzmikrometer).

6.3.3 Bestimmung der *C. b.*-Lebendkeimzahl im KID₅₀-Test

Für die Bestimmung von *C. b.*-Lebendkeimzahlen in wässrigen Lösungen wurden zunächst BGM-Zellen in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) mit je 3-6 x 10³ Zellen pro Vertiefung ausgesät und 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) adhären gelassen. Vor Beginn der Titration wurde der Zellrasen lichtmikroskopisch auf Konfluenz überprüft und das Medium gewechselt. Die Polystyrolröhrchen mit den infizierten Makrophagen wurden nach dem Auftauen mit Ultraschall (Sonifier B-12, Branson Sonic) für 5 s behandelt. Dieses Verfahren dient der Vereinzelung der Coxiellen. In 4-fachen Ansätzen wurden dann jeweils 132 µl der Coxiellen-Suspension in die ersten 4 Vertiefungen der ersten Reihe der Mikrotiterplatte gegeben und mit einer log₄-Verdünnung die Suspension austitriert. Hierfür wurden jeweils 33 µl der Suspension in die nächste Reihe gegeben, resuspendiert und die Spitzen der Mehrkanalpipette gewechselt. Als Positivkontrolle diente eine eingestellte Nml-Suspension (1 x 10⁵ Partikel/ml). Die Mikrotiterplatte wurde anschließend 1 h bei 37 °C und 2.415 x g zentrifugiert und für 8 Tage im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Für die Auswertung wurde ein Phasenkontrast-Mikroskop verwendet, mit welchem man jede Vertiefung auf Vakuolenbildung überprüfte. Jede Vertiefung mit einer Vakuole wurde als positiv bewertet. Die Lebendkeimzahl wurde als kulturinfektiöse Dosis 50 % pro Milliliter Testsuspension (KID₅₀/ml) nach Spearman und Kärber (Spearman und Kärber 1974) berechnet.

6.3.4 Differenzierung des *C. b.*-Phasentyps

Für die Bestimmung des Phasentyps wurde zunächst das LPS der Coxiellen nach Kersh isoliert und aufgereinigt (Kersh et al. 2011). Hierfür wurden 500 µl einer *C. b.*-Suspension (5 x 10¹⁰ Partikel/ml in *A. dest.*) für 5 s mit Ultraschall (Sonifier B-12, Braunson Sonic) behandelt, 500 µl Rothiphenol hinzugefügt und gründlich gemischt. Dem folgten ein Inkubations-

Methoden

schritt für 10 min bei 100 °C und ein anschließender Zentrifugationsschritt (14.000 x g, 8 min, 4 °C). Nach der Zentrifugation entstanden zwei definierte Phasen, die obere wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die untere mit 500 µl *A. dest.* versetzt, gründlich gemischt und 5 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (14.000 x g, 8 min, 4 °C). Die obere Phase wurde mit der ersten Abnahme vereinigt und bei -70 °C gelagert. Die untere Phase wurde verworfen. Die tiefgefrorene obere Phase wurde in einer Gefriertrocknungsanlage (Christ Alpha 2-4) bei <1 mbar und -80 °C für mehr als 24 h lyophilisiert. Das gewonnene Lyophilisat wurde bei 4 bis 8 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Auftrennung des LPS mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese wurde zunächst zu den Lyophilisaten 50 µl Probenpuffer nach Laemmli hinzugefügt und anschließend von jeder Probe eine Verdünnungsreihe (log₂ mit Probenpuffer) angesetzt. Die verdünnten Proben wurden für 3 min bei 100 °C inkubiert und zu je 10 µl auf Fertiggel (4-20 % Tris/Glycin-Gel) aufgetragen. Da die zu erwartende Bandengröße bei 5 bis 20 kDa lag, wurde ein Proteinmarker (5 µl Auftragevolumen) im Bereich von 3,5 bis 100 kDa eingesetzt. Die Elektrophorese wurde in einer Minigel-Twin Kammer (Biometra) bei 120 V durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einer Silberfärbung. Hierfür wurden zwei verschiedene Kits (PageSilver Silver Staining Kit oder Roti-Black P Kit) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

6.3.5 Charakterisierung der bakteriellen Morphologie mittels Negativ-Kontrast-Verfahren

Für die morphologische Darstellung der Coxiellen mit Hilfe des Negativ-Kontrast-Verfahrens wurde im S3-Labor 50 µl der *C. b.*-Suspension mit 50 µl 2,5 % Glutaraldehyd mit Glucose vermischt und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Innerhalb dieser Zeit erfolgt die Fixierung und Inaktivierung der Bakterien. Die Aufarbeitung und Auswertung der Proben wurde im Institut für Molekulare Pathogenese (FLI, Jena) durch Prof. Dr. Liebler-Tenorio durchgeführt.

6.4 Molekularbiologische Methoden

6.4.1 RNA-Isolierung aus Makrophagenkulturen

Für die Extraktion der Gesamt-RNA aus Makrophagenkulturen wurde ein kommerziell erhältliches Isolierungskit (RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen) verwendet. Zunächst wurden alle Proben langsam bei RT aufgetaut. Um eine vollständige Homogenisierung des Zelllysats zu erzielen, wurde dieses auf eine RNeasy[®] Shredder Säule gegeben und 2 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend mit 350 µl 70 %igem Ethanol versetzt und vorsichtig resuspendiert bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Dann wurde das Ethanol-Lysat-Gemisch auf eine RNeasy[®] Mini Spin Säule überführt und 5 s bei 8.000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Inhaltes des Sammelgefäßes wurden 350 µl RW1-Puffer auf die

Methoden

Säule gegeben und wiederum zentrifugiert (15 s, 8.000 U/min). Anschließend wurden die Säulen einem DNA-Verdau unterzogen. Hierfür wurde zunächst die in RNase-freiem Wasser gelöste DNase I-Stammlösung im RDD-Puffer in einem Verhältnis von 1:7 vorsichtig verdünnt und jeweils 80 µl des DNase-Inkubationsmixes direkt auf die Säulenmembran gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurden die Säulen mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen (15 s, 8.000U/min). Der Durchlauf wurde mit dem Sammelgefäß verworfen und ein neues Sammelgefäß verwendet, 500 µl RPE-Puffer auf die Membran gegeben und 15 s bei 8.000 U/min zentrifugiert. Nach Entfernen des Durchflusses erfolgte ein weiterer Waschschritt mit 500 µl RW1-Puffer (2 min, 8.000 U/min). Um die Membran von Resten des Waschpuffers zu befreien, wurden die Säulen 1 min bei maximaler Geschwindigkeit (14.000 U/min) zentrifugiert. Für die Elution wurden 0,8 µl RNase-Inhibitor (ca. 32 Units) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und die Säule in das Gefäß überführt. Anschließend wurden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben und 2 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Die im Durchfluss enthaltene RNA wurde mittels Photometer auf Reinheit und Konzentration überprüft (6.4.2) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

6.4.2 Quantifizierung der mRNA-Expression

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (nano-Drop®ND1000, Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Absorption von 1 entspricht dabei 40 µg RNA pro ml und geht als Konstante in folgende Gleichung ein:

$$\frac{40 \times A_{260}}{1000} = c \frac{\mu\text{g}}{\mu}$$

Eine Aussage über die Reinheit der RNA wird aus dem Quotienten A_{260}/A_{280} getroffen, der bei RNA optimal einen Wert von 2 einnimmt. Ist der Wert unter 1,5 so liegt eine Proteinkontamination vor (Glasel 1995).

6.4.2.1 Reverse Transkriptase-PCR

Das Umschreiben von RNA in die komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit Hilfe einer retroviralen Reversen Transkriptase und *random-primer*. Für die Reaktion wurden 0,25 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 12 µl eingestellt. Anschließend wurde die *template*-RNA denaturiert (5 min, 65 °C) und folgende Reagenzien hinzugefügt:

10 fach RT-Puffer	2 µl
5 mM dNTP's Mix	2 µl
10 µM <i>random primer</i>	1 µl
20 U RNase-Inhibitor	1 µl
4 U Reverse Transkriptase	1 µl

Methoden

Die anschließende Reverse Transkription erfolgte im „Thermocycler“ (Biometra) in folgenden Inkubationsschritten:

- 60 min, 37 °C
- 5 min, 93 °C.

6.4.2.2 Echtzeit-PCR (*real-time* PCR)

Die *real-time* PCR dient der quantitativen Bestimmung von PCR-Produkten. Amplifikate werden durch die Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff erfasst. Als Farbstoff wurde SYBR Green I (Cyanin-Farbstoff) verwendet, welcher mit der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA interkaliert. Der entstehende DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 497 nm und emittiert im Vergleich zu freiem SYBR Green I ein vielfach stärkeres Fluoreszenzlicht (Zipper et al. 2004). Das resultierende Signal verhält sich proportional zur DNA-Konzentration und nimmt mit ansteigender Zyklenzahl an Intensität zu.

Für eine Reaktion wurde der folgende Ansatz verwendet:

2x „QuantiFast SYBR Green PCR master mix“	12,50 µl
Nuclease freies H ₂ O	6,75 µl
<i>forward primer</i> (5 µM)	2,25 µl
<i>reverse primer</i> (5 µM)	2,25 µl
cDNA	1,25 µl

Neben den Proben wurden eine H₂O-Kontrolle und ein Standard als interne Kontrolle mitgeführt. Die Reaktion wurde am ABI Prism®7500 (Applied Biosystem) mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

- 95 °C, 10 min
- 95 °C, 15 s
- 60 °C, 1 min
- 39 Zyklen: 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min
- 95 °C, 30 s
- 60 °C, 15 s

Nach der Reaktion wurde die Spezifität der PCR-Produkte durch das Erstellen einer Schmelzkurve überprüft. Hierfür erfolgte eine schrittweise Erhöhung der Temperatur, die DNA-Doppelstränge denaturierten und das gebundene SYBR Green I wurde freigesetzt, welches eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung ermöglichte. Da jedes Produkt aufgrund der Basenzusammensetzung eine unterschiedliche Schmelztemperatur T_M besitzt, konnten anhand der Schmelzpunkte unspezifische Bindungen von SYBR Green I unterschieden werden.

6.4.2.3 Relative Quantifizierung (Auswertung der *real-time* PCR)

Für die Auswertung der *real-time* PCR wurde die Quantifizierungsstrategie der relativen Quantifizierung angewandt. Diese basiert auf die Normalisierung der Expression des Zielgens auf ein nicht reguliertes *housekeeping* Gen (HKG), wodurch die Varianz der Expression des Zielgens reduziert wird. Die Berechnung der Expressionsänderung „Ratio“ erfolgte mittels eines Effizienz-korrigierten Modells über die Normalisierung der PCR-Produkte auf das HKG *gapdh*. Die Effizienz wurde für jede Probe bzw. *primer*-Paar über den Anstieg der sigmoidal verlaufenden Fluoreszenzsignalkurve mit Hilfe der Software „LinReg“ bestimmt. Die Berechnung der Effizienz erfolgte nach der Formel:

$$E = 10^{\left[-\frac{1}{\text{Anstieg}}\right]}$$

Die Ratio wurde mit Hilfe der Software „REST-384“ („Relative Expression Software Tool-384-Version 2“, Pfaffl) bestimmt. Dieses Programm ermöglicht eine statistische Aussage der Genexpression bei n+1 Wiederholungen. Dabei werden die C_t -Werte der einzelnen Gruppen gemittelt und auf das HKG mit Einberechnung der Effizienzvarianz normalisiert. Die Berechnung erfolgte über die Formel:

$$R = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{\Delta C_t \text{Zielgen (MW Kontrolle - MW behandelt)}}}{E_{\text{Referenzgen}}^{\Delta C_t \text{Referenzgen (MW Kontrolle - MW behandelt)}}$$

Die Ergebnisse wurden anschließend statistisch anhand eines Randomisierungstests erfasst (Pfaffl et al. 2002). Bei diesem Verfahren werden mögliche Einflussfaktoren innerhalb der Gruppen die zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen könnten, verrechnet und eine Aussage über die Ratio mit entsprechender Signifikanz getroffen. Die Ratio wurde anschließend in einem relativen Verhältnis zur Kontrollgruppe dargestellt. Es wurde hierbei neben der mathematischen auch eine biologische Signifikanz eingeführt. Bei einer Ratio von 0,8 bis 2 wurde angenommen, dass ein Gen in Folge der Behandlung unverändert zur Kontrolle exprimiert wurde. Das Unterschreiten eines Wertes von 0,8 oder das Überschreiten eines Wertes von 2 wurde als im Vergleich zur Kontrolle biologisch signifikant verminderte bzw. erhöhte Expression des Gens interpretiert.

6.4.3 Quantifizierung der *C. b.*-Genomäquivalente

Für die Quantifizierung von *C. b.*-Genomäquivalenten (GE) wurde eine *real-time* PCR verwendet, welche das Gen der bakteriellen *icd* amplifiziert. Das *icd*-Gen ist pro Bakterium nur einmal vorhanden und hochkonserviert. Dies ermöglicht die Quantifizierung einer Vielzahl von *C. b.*-Stämmen (Klee et al. 2006). Die Methode basiert auf einer *real-time*-Taq[®]-PCR, bei der nach Spaltung einer fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sonde durch die 5'-3'-Exo-

Methoden

nukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase ein Fluoreszenzsignal freigesetzt wird, welches proportional zur Amplifikation des Gens verläuft. Für eine Reaktion der PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

<i>A. dest.</i>	5,6 µl
Fermentas Maxima Probe qPCR master-mix (2 x)	10,0 µl
<i>primer 1</i> : <i>icd-439_F</i> (7,5 µM)	0,8 µl
<i>primer 2</i> : <i>icd-514_R</i> (7,5 µM)	0,8 µl
Sonde: <i>icd-464_{TM}</i> (2,5 µM)	0,8 µl
<i>template</i> DNA/Plasmid-Standard	2,0 µl

Als *template*-DNA wurde erhitzte Biomasse (MDM-Suspension, 95 °C, 30 min) verwendet. Vor Zugabe in die PCR erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit (14.000 rpm) für ca. 1 min. Dabei setzten sich Zelldebris, welcher sich störend auf die PCR auswirken können, als Pellet ab. Nach Verteilen des *master-mixes* und Zugabe des *templates* bzw. des Plasmid-Standards (Verdünnungsreihe des *icd*-Plasmids von 10⁰ bis 10⁵ Kopien) auf eine Mikrotiterplatte (96-Vertiefungen) wurde folgendes Temperaturprofil im „Thermocycler“ (Stratagene MX3000) verwendet:

- 50 °C, 2 min
- 95 °C, 10 min
- 50 Zyklen: 95 °C, 15 s; 60 °C, 30 s.

Für die Auswertung wurde die Strategie der absoluten Quantifizierung gewählt. Hierbei wird die absolute Genkopienanzahl anhand einer Standardkurve ermittelt. Die Standardkurve wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eines Plasmid-Standards erstellt, der einen Abschnitt des *icd*-Gens enthält. Die *icd*-Kopien des Standards wurden anschließend gegen den entsprechenden C_T-Wert aufgetragen und eine Korrelationsgerade erstellt. Anhand der Geradengleichung konnte für Proben mit unbekanntem *C. b.*-Gehalt die *icd*-Kopienanzahl bestimmt werden. Dabei entsprach eine *icd*-Kopie einem *C. b.*-Partikel.

6.4.4 Genotypische Charakterisierung der *C. b.*-Isolate

6.4.4.1 Multiplex-PCR für die Plasmiddifferenzierung und *adaA*-PCR

Für beide Multiplex-PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

2 x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5,0 µl
Auftragspuffer	1,0 µl
<i>A. dest.</i>	2,0 µl
<i>primer</i> -Mix	0,5 µl
<i>template</i> DNA	1,0 µl

Für die Plasmiddifferenzierung mittels Multiplex-PCR wurde der *primer*-Mix (16 µM) wie folgt zusammengesetzt: QpH1F, QpH1R, QpRSF, QpRSR, QpDVF, QpDVR, ScurryF und ScurryR (2 µM pro *primer*).

Der *primer*-Mix (8 µM) für die *adaA*-PCR bestand aus den Primern *adaAF*, *adaAR*, Trans1 und Trans2 (2 µM pro *primer*). Die *primer* Trans1 und Trans 2 erkennen eine Transposon-Sequenz, welche in allen *C. b.*-Stämmen vorkommt und in der PCR als interne Kontrolle dient. Für beide PCR-Ansätze wurde folgendes Temperaturprofil für die Amplifikation verwendet:

- 95 °C, 15 min
- 35 Zyklen: 95 °C, 30 s; 58 °C, 90 s; 72 °C, 30 s
- 72 °C, 10 min.

Die Auswertung erfolgte über eine analytische Agarose-Gel-Elektrophorese.

6.4.4.2 *Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis* (MLVA)

Zur Genomtypisierung der *C. b.*-Stämme wurden 7 verschiedene Primer eingesetzt: Cox1F/Cox1R, Cox2F/Cox2R, Cox3F/Cox3R, Cox4F/Cox4R, Cox5F/Cox5R, Cox6F/Cox6R, Cox7F/Cox7R. Folgender PCR-Ansatz wurde pro Reaktion verwendet:

2 x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5,0 µl
<i>forward primer</i> (0,2 µM)	2,0 µl
<i>reverse primer</i> (0,2 µM)	2,0 µl
<i>template</i> DNA	1,0 µl

Die PCR-Reaktion fand unter folgendem Temperaturprofil statt:

- 95 °C, 15 min
- 24 Zyklen: 95 °C, 30 s; variabel (s. u.), 90 s; 72 °C, 30 s
- 72 °C, 10 min.

Methoden

Die *annealing*-Temperatur der *primer*-Paare variierte wie folgt:

- 54 °C: Cox1F/Cox1R, Cox3F/Cox3R und Cox6F/Cox6R
- 57 °C: Cox2F/Cox2R und Cox5F/Cox5R
- 53 °C: Cox7F/Cox7R.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines LI-COR 4200 DNA *Sequencing System*. Aufgrund der Größe des Cox4F/Cox4R-Amplifikats wurde das PCR-Produkt auf einem speziellen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Weiterhin wurde der PCR-Reaktionsansatz wie folgt verändert:

2 x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	10,0 µl
<i>forward primer</i> (0,2 µM)	2,0 µl
<i>reverse primer</i> (0,2 µM)	2,0 µl
Auftragspuffer	2,0 µl
<i>A. dest.</i>	4,0 µl
<i>template</i> DNA	1,0 µl

Die PCR-Reaktion fand unter folgendem Temperaturprofil statt:

- 95 °C, 15 min
- 35 Zyklen: 95 °C, 30 s; 58 °C, 90 s; 72 °C, 30 s
- 72 °C, 10 min.

6.4.4.3 Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Amplifikate aus der Multiplex-PCR zur Plasmiddifferenzierung sowie der *adaA*-PCR wurden auf einem 2 %igen Agarosegel (+ 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) bei 1,25 V/cm für 45 bis 60 min aufgetrennt. Dafür wurden 10 µl der PCR-Produkte mit 2 µl 6 x Loading Dye gemischt und davon 10 µl auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente ein 100 bp-Leiter (Gene Ruler™, Fermentas). Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator dokumentiert.

6.4.4.4 Analytische Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Amplifikate der MLVA mussten aufgrund der geringen Längenunterschiede auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden. Die Elektrophorese wurden für die Amplifikate der Cox4-PCR in Minigel-Twin-Elektrophoresekammern (Biometra) und die anderen in einem LI-COR 4200 DNA *Sequencing System* (LI-Cor) durchgeführt. Für die Auftrennung der Amplifikate der Cox4-PCR wurde ein 5,56 %iges Polyacrylamidgel mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Methoden

1 x TAE	5,72 ml
30 % Acrylamid	0,84 ml
10 % Ammoniumperoxodisulfat	30 µl
TEMED	5 µl

Das Gel wurde in vertikal angeordneten Glasplatten mit einem Kamm für Probetaschen gegossen und nach einer Polymerisation von 40 bis 60 min in die Minigel-Twin-Kammer eingehängt, welche anschließend mit 1 x TAE-Puffer befüllt wurde. Die Proben wurden 1:1 mit Ladepuffer versetzt und jeweils 10 µl in die Probetasche aufgetragen. Als Größenstandard diente ein 100 bp DNA-Lader (Gene Ruler™, Fermentas). Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte bei 80 V für 2 h mit einer anschließenden Färbung des Geles im Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) für 10 min und Wässerung für weitere 10 min. Am Transilluminator wurden die Gele dokumentiert.

Für die Auftrennung mit dem LI-COR 4200 Sequencing System mussten die beiden Glasplatten vor dem Gießen der Gele gründlich mit Micro-90® sowie Wasser gereinigt und im Anschluss mit 70 %igen Isopropanol gespült werden. Die verwendeten Polyacrylamidgele (6 %) setzten sich wie folgt zusammen:

Harnstoff	8,4 g
Long Range Gel Solution	2,4 ml
10 x TBE-Puffer	2,4 ml
<i>A. dest.</i>	ad 22,5 g

Unmittelbar vor dem Gießen des Geles wurden 135 µl 10 %iges Ammoniumperoxidisulfat sowie 13,5 µl TEMED hinzugefügt. Nach der Polymerisation des Geles (ca. 1,5 h) konnte dieses in den LI COR 4200 *DNA Sequencer* eingehängt und das obere sowie untere Pufferreservoir mit 1 x TBE befüllt werden. Die Proben wurden vor dem Auftragen 1:1 mit LI COR-Auftragspuffer (Gebrauchslösung) verdünnt, für 3 min bei 92 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Als Größenstandard dienten PCR-Amplifikate mit folgender Längen: 71 bp, 141 bp, 180 bp, 225 bp und 281 bp.

Vor der Elektrophorese wurde das Gel zunächst auf die Laufbedingungen für 15 min konditioniert. Anschließend erfolgte das Auftragen der Proben sowie der Größenstandards und die Elektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1500 V, 40 mA, 60 W 50 °C für 120 min. Die Detektion der Elektrophoresedaten erfolgte in Echtzeit mit dem Programm e-seq® V 2.0 (LI-COR). Die Auswertung des Gelbildes erfolgte mit dem Programm 1DscanEX (BD Biosciences-scanalytics).

6.5 Immunologische Methoden

6.5.1 IL-1 β Sandwich-ELISA

Für den Nachweis des bovinen Proteins IL-1 β wurde ein *in-house-sandwich*-ELISA etabliert und verschiedene Methoden auf die Eignung zur Inaktivierung von *C. b.* in Zellkulturüberständen bei gleichzeitiger Schonung der IL-1 β -Integrität überprüft. Die am besten geeignete Inaktivierungsmethode erwies sich die Bestrahlung mit UV-Licht für zwei Stunden (Mager 2013). Alle Überstände von bovinen MDM wurden vor dem Ausschleusen aus dem S3-Labor entsprechend mit UV-Licht inaktiviert. Anschließend mussten die Proben für den Einsatz im ELISA konzentriert werden, da die enthaltene IL-1 β -Menge für das Testsystem zu gering war. Hierfür wurde die gesamte Probe auf eine „Amicon Ultra 4 Säule 10k“ aufgetragen und 7 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Für die serologische Bestimmung des IL-1 β -Gehalts wurden zunächst Maxisorp-Platten mit je 100 μ l in Reagenzienverdünnungspuffer verdünntem Fungantikörper „MCA1658“ (1.000 ng/ml) pro Vertiefung beschichtet und anschließend bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten dreimal mit 150 μ l ELISA-Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte das Auftragen von 150 μ l Blockpuffer pro Vertiefung und einer Inkubation für zwei Stunden bei RT. Anschließend wurde jede Platte drei weiteren Waschschritten unterzogen und pro Vertiefung 100 μ l der konzentrierten Probe bzw. des Standards (rekombinantes bovines IL-1 β) aufgetragen. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit der Ausgangskonzentration von 400.000 pg/ml angefertigt, welche bis zur Endkonzentration von 4 pg/ml 1:10 verdünnt wurde. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurden die Platten wiederum dreimal gewaschen. Der primäre Antikörper „AHP 423“ wurde 1:1.000 mit Blockpuffer verdünnt, auf die Platten aufgetragen und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT mit 1:50.000 verdünntem Detektionsantikörper „STAR124P“. Anschließend wurde dieser durch einen letzten Waschschrift aus den Vertiefungen entfernt, je 100 μ l gebrauchsfertige TMB-Substratlösung pro Vertiefung hinzugefügt und 10 min bei RT inkubiert. Das Abstoppen der enzymatischen Reaktion erfolgte mit 1 n Schwefelsäure. Die Extinktionen konnten mit dem Photometer (Sunrise™, TECAN) bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 550 nm gemessen werden. Anhand der Standardverdünnungen konnte eine Kalibrierungsgerade erstellt werden, um die unbekannte IL-1 β -Konzentration der Proben bestimmen zu können. Hierbei wurden die Extinktionen gegen den Logarithmus der definierten Konzentrationen der Standards aufgetragen und mittels linearer Regression die Geradengleichung ermittelt.

6.5.2 Western-Blot für IL-1 β Nachweis

C. b.-infizierte bovine MDM wurden mit 500 μ l Laemmli Puffer (2 x) von der Oberfläche der Zellkulturgefäße gelöst und das Protein 10 min bei 100 °C denaturiert. Für die Auftrennung der Probe wurde ein Bis-Tris-Gradientengel (4-12 %) verwendet. Die Proben wurden nach Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford mit einer gleichen Konzentration auf das Fertigel aufgetragen. Ein definierter Standard sowie eine Positivkontrolle (rekombinates bovines IL-1 β) wurden mitgeführt. Nach der Elektrophorese (30 mA, 70-200 V) wurde das Gel entnommen und das Trenngel vom Sammelgel gelöst. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierfür wurde die Membran zunächst 15 s in Methanol inkubiert und danach mit *A. dest.* für 2 min gewaschen. Für das Blotten wurde eine Schichtung aus verschiedenen Lagen blasenfrei aufgebaut. Die Transferrichtung der Proteine erfolgte von der Kathode zur Anode. An der Anoden-Seite wurden auf zwei Transfer-Puffer-getränkten Filterpapieren die Membran und das Trenngel gelegt. Der schichtweise Aufbau schloss mit zwei Transfer-Puffer-getränkten Filterpapieren an der Kathoden-Seite ab. Das Blotten erfolgte bei 12 V für 15 min. Anschließend wurde die Blot-Membran für mindestens 1,5 h in der Blockierungs-Lösung unter Schütteln inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift in TBS-Tween unter Schütteln für 10 min erfolgte die Inkubation des in PBS-Tween verdünnten Primär-Antikörpers (AHP 423, 1:1000) über Nacht bei 5-10 °C. Dem schloss sich ein weiterer Waschschrift mit PBS-Tween (dreimal für 10 min unter Schütteln) an. Danach wurde die Membran mit einem in PBS-Tween-verdünnten Sekundär-Antikörper (anti-Mouse-IgG1-AP, 1:1500), welcher mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war, für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften (PBS-Tween, 10 min unter Schütteln) wurde die Membran ein zweites Mal mit einem alkalischen Phosphatase-Puffer (5 min unter Schütteln) gewaschen. Daraufhin erfolgte die Entwicklung der Membran mit einer Immunfärbelösung für 10 bis 30 min unter Schütteln. Die Färbereaktion wurde nach dem Erscheinen von Reaktionsbanden durch Abspülen der Membran mit *A. dest.* gestoppt und die Membran auf Filterpapier getrocknet.

6.5.3 Durchflusszytometrie

6.5.3.1 Immundekoration zur Quantifizierung der Zellzusammensetzung

Um die Reinheit der MDM-Kulturen zu überprüfen, wurde durch den Einsatz von zellpopulationsspezifischen Antikörpern die Zellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellen mussten für die Vorbereitung der Färbung zunächst von der Oberfläche der Zellkulturplatte (6 Vertiefungen) gelöst werden. Hierfür wurde das Medium abgenommen, in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und pro Vertiefung jeweils 2 ml Accutase hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) konnten die Zellen

von der Oberfläche gelöst werden. Die Zellsuspension wurde anschließend mit dem Medium in 15 ml-Zentrifugenröhrchen vereinigt und 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem entsprechenden Volumen in PBS-Puffer aufgenommen. In eine Mikrotiterplatte (V-Form, Fa. Greiner) wurden pro Vertiefung 100 µl Zellsuspension gegeben. Nach einer Zentrifugation (4 min, 400 x g, 4 °C) wurde der Überstand ausgeschlagen, die Zellpellets in Primär-Antikörper-Lösungen bzw. in Kontrollansätzen in FACS-Waschpuffer resuspendiert und die Platte bei RT für 20 min in Dunkelheit inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4 min, 400 x g, 4 °C) wurden die Zellpellets mit 100 µl FACS-Waschpuffer gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit je 50 µl verdünntem Sekundär-Antikörper bzw. PBS-Puffer resuspendiert und 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 100 µl FACS-Waschpuffer (4 min, 400 x g, 4 °C) wurden die Pellets in 150 µl FACS-Waschpuffer aufgenommen und die Messung am BD FACSCanto™ II-Durchflusszytometer durchgeführt.

6.5.3.2 Immundekoration zur Quantifizierung des Aktivierungsgrades von MDM

Gemäß des Infektionsprotokolls (6.2.4) wurden die MDM 24 h *p. i.* bezüglich ihres Aktivierungsgrades durchflusszytometrisch untersucht. Die Infektion und die Färbung mit den primären Antikörpern fanden unter den Bedingungen der Schutzstufe S3 statt. Die MDM wurden 24 h *p. i.* von der Oberfläche der Zellkulturplatte gelöst. Hierfür wurde zunächst das Medium abgenommen und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Lösen der Zellen wurde Accutase-Lösung hinzugefügt und die Zellkulturplatte 30-40 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Das Ablösen der stimulierten Zellen erforderte eine längere Inkubationszeit als die nicht-stimulierte Kontrolle, da die MDM deutlich stärker an die Oberfläche der Kulturplatte adhärten. Die Zellen wurden durch kräftiges Spülen mit PBS-Puffer von ihrer Matrix gelöst und im 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit dem Medium vereinigt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 400 x g, 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen an PBS-Puffer aufgenommen und je 100 µl der Zellsuspension pro Vertiefung auf eine Mikrotiterplatte (V-Form, Fa. Greiner) verteilt. Die Platten wurden in einer Aerosol-dichten-Zentrifuge zentrifugiert (4 min, 400 x g, 4 °C) und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in je 50 µl Gebrauchslösung des primären Antikörpers (verdünnt in PBS-Puffer) bzw. PBS-Puffer als Kontrollansatz resuspendiert und 20 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4 min, 400 x g, 4 °C) wurden die Pellets mit je 100 µl FACS-Waschpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 100 µl 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die Platten wurden mit einer Folie aerosoldicht abgeschlossen und 24 h bei 4 °C inkubiert. Die Fixierung wurde entsprechend der inaktivierenden Wirkung auf *C. b.* in Vorversuchen als wirksam getestet. Nach

Methoden

der Inkubation wurden die Platten äußerlich desinfiziert und aus dem S3-Labor ausgeschleust. Nach einem Zentrifugationsschritt (4 min, 400 x g, 4 °C) wurde das Paraformaldehyd unter dem Abzug verworfen, die Zellpellets mit 100 µl FACS-Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand ausgeschlagen, die Zellen in 50 µl Sekundär-Antikörper-Lösung bzw. in PBS-Puffer resuspendiert und 20 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 100 µl FACS-Waschpuffer wurden die Zellpellets in 150 µl FACS-Waschpuffer aufgenommen.

6.5.3.3 Analysestrategie im Durchflusszytometer

Zur Probeanalyse wurde ein BD FACSCanto™ II-Gerät mit angeschlossenem BD *High Throughput Sampler* (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Die anhand von Vorversuchen eingestellten Geräteparameter wurden in Form von Standardprotokollen gespeichert und für alle weiteren Messungen verwendet. Die Auswertung der Messwerte erfolgte über die Software BD FACSDiva™. Die Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen wurde über die Parameter Größe (Vorwärtsstreulicht oder *forward scatter*), Granularität (Seitwärtsstreulicht oder *sideward scatter*) und Fluoreszenzeigenschaften (spezifische Kanäle) erzielt. Die verschiedenen Zellpopulationen konnten mit Hilfe von elektronisch gesetzten Auswertefenstern (*gates*) zusammengefasst und anhand ihrer morphologischen Eigenschaften genauer analysiert werden. Von jedem Probenansatz wurden strichprobenartig 5.000 Zellen gezählt, analysiert und als Gesamtzellzahl einer Probe definiert. Die Auswertung erfolgte durch die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), welches ein Maß für die Expressionsstärke eines Antigens darstellt. Die gemessenen Werte für die MFI von stimulierten Proben wurden in Relation zur Zellkontrolle gesetzt, um vergleichende Aussagen über die Expression eines Antigens auf der Oberfläche von Zellen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen treffen zu können.

6.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Statistik-Programm XLSTAT durchgeführt. Es erfolgte zunächst die deskriptive Statistik der Daten und eine Überprüfung der Normalverteilung. Hierfür wurden der Shapiro-Wilk-Test und der Anderson-Darling-Test mit dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ verwendet. Bei normalverteilten Daten wurde ein *t*-Test angewandt. Wurde die 0-Hypothese der Normalverteilung zurückgewiesen, wurden die Daten mit nicht parametrischen Tests (Mann-Whitney-U-Test) ausgewertet. Bei einer geringen Stichprobenanzahl ($n = 3$ ohne technische Replikate) wurde eine Multivarianzanalyse mit Greenhouse-Geißer-Korrektur angewandt. Die statistische Prüfung der *real-time* PCR Ergebnisse erfolgte mit einem in der Software REST enthaltenen Randomisierungstest (Pfaffl et al. 2002). Das Signifikanzniveau wurde wie folgt definiert: *: $p \leq 0,05$ und **: $p \leq 0,01$.

7 Ergebnisse

7.1 Charakterisierung der primären Makrophagenkulturen

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen *C. b.* und Makrophagen wurden primäre bovine und humane MDM sowie bovine Alveolarmakrophagen verwendet. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte anhand ihrer Morphologie und bezüglich der Expression von verschiedenen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren.

7.1.1 Kultivierung von Makrophagen

Für die Isolation der bovinen und humanen MDM mussten zwei verschiedene Methoden angewandt werden, da keines der Verfahren auf beide Spezies anwendbar war. So wurden die bovinen MDM-Kulturen mit Hilfe eines Teflon-Beutel-Verfahrens und die humanen MDM-Kulturen mit einem Plattenadhäsions-Verfahren generiert. Im Vergleich zu MDM waren die aus der BALF von Kälbern gewonnenen bovinen Alveolarmakrophagen bereits ausgereift und wurden mit Hilfe des Platten-Adhäsionsverfahrens in Kultur genommen. Die Vitalität der bovinen und humanen Makrophagen wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen (ohne Mediumwechsel) anhand der Morphologie und mittels Trypanblaufärbung überprüft. Im Untersuchungszeitraum veränderte sich die Zellmorphologie mikroskopisch nicht. Die Zellen blieben adhärent an der Trägerfläche und nach einer Trypanblaufärbung konnten 94 % ± 2 % der Zellen als vital beurteilt werden.

7.1.2 Morphologie und Reinheitsgrad der Makrophagenkulturen

Bovine MDM wiesen eine heterogene Morphologie auf und variierten in Form und Größe. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen stellten sie sich als polymorphe Zellen mit einer spindel- bis kugelförmigen Morphologie dar (Abbildung 2 A). Abhängig von der Schnittebene waren auf der Oberfläche der MDM zahlreiche lange Pseudopodien und hakenförmige Zytoplasma-Ausstülpungen vorhanden. Um den nierenförmigen Zellkern, welcher nicht in allen Schnitten zu sehen war, lokalisierten sich Mitochondrien. Der ausgedehnte Golgi-Apparat umfasste zudem zahlreiche Lysosomen. Selten waren dagegen Endosomen oder Phagolysosomen zu finden (Abbildung 2 B). Humane MDM wiesen im Vergleich zu den bovinen MDM morphologische Unterschiede auf. Im Lichtmikroskop besaßen die Zellen eine kugelige Gestalt ohne erkennbare Ausstülpungen (Abbildung 2 C). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden auf der Oberfläche zahlreiche Plasmopodien sichtbar, die im Vergleich zu bovinen MDM jedoch deutlich verkürzt waren (Abbildung 2 D). Der nierenförmige Zellkern konnte nicht in allen Schnittebenen deutlich erkannt werden. Ihn umgab

ein nicht stark ausgeprägter Golgi-Apparat mit rauem endoplasmatischem Retikulum (ER). Mitochondrien waren vereinzelt in der Zelle vorhanden und zentrierten sich vermehrt um den Zellkern. Im Vergleich zu bovinen MDM besaßen humane MDM zahlreiche Lysosomen mit einer kugeligen Form. Die bovinen Alveolarmakrophagen zeigten lichtmikroskopisch eine ähnlich abgerundete Morphologie wie humane MDM und bildeten nur vereinzelt Pseudopodien aus (Abbildung 2 E). In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 2 F) wurde der nierenförmige Zellkern sichtbar, den ein Golgi-Apparat umgab. Die Zelle wies zudem vereinzelt Mitochondrien in Kernnähe und zahlreiche Lysosomen auf.

Der Reinheitsgrad der MDM-Kulturen wurde vor der Infektion durchflusszytometrisch bestimmt. Bovine und humane MDM wiesen einen hohen Reinheitsgrad auf. Der Makrophagenmarker CD14 wurde bei 81 % ($\pm 2,76^1$) der bovinen und 85 % der humanen MDM nachgewiesen. In bovinen MDM-Kulturen wurden neben Makrophagen, 8 % B-Zellen ($\pm 2,4^1$), 5 % CD4 ($\pm 4,4^1$), 4 % CD8 T-Zellen ($\pm 3,5^1$), und 2 % $\gamma\delta$ T-Zellen ($\pm 1,1^1$) nachgewiesen. Die humane MDM-Kultur setzte sich neben dem CD14-positiven Zellanteil wie folgt zusammen: 10 % B-Zellen, 4,2 % T-Zellen und 2,35 % DC. Durch die lange Inkubationsdauer und die mehrfachen Waschschriffe bei der Infektion reduzierte sich der Anteil an CD14-negativen Zellen stetig. Der Reinheitsgrad der bovinen Alveolarmakrophagenkultur wurde lichtmikroskopisch beurteilt. In der BALF konnte anhand der Größe und Granularität mehr als 98 % der enthaltenen Zellen als Makrophagen identifiziert werden.

Weiterhin wurden die Makrophagenkulturen auf das Vorhandensein der für die Internalisierung von *C. b.* spezifischen Rezeptoren CR3 und $\alpha_v\beta_3$ untersucht. Alle Zellen exprimierten im nicht stimulierten Zustand beide Rezeptoren auf ihrer Oberfläche.

7.1.3 *E. coli* LPS-induzierte Immunreaktion in Makrophagenkulturen

Für Untersuchungen zur Interaktion der Makrophagen mit *C. b.* musste die Aktivität der isolierten Zellen überprüft werden. Als Stimulanz wurde *E. coli* LPS mit einer vorab getesteten Konzentration von 6 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Nach der Stimulation wurde die Zellaktivität durch die Messung der mRNA-Menge verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine sowie Chemokine bestimmt. Wie in Tabelle 11 dargestellt, konnte sowohl bei humanen als auch bovinen MDM bereits nach einer Stimulation von 3 h eine deutliche Induktion der Expression diverser Zytokine und Chemokine nachgewiesen werden. Besonders Th1-spezifische Zytokine, wie IL-1 β , IL-12 und TNF- α , wiesen eine stark erhöhte mRNA-Konzentration bei bovinen und humanen MDM auf. Die Transkription von Mediatoren, die eine Th2-spezifische Immunantwort unterstützen, wurden im Vergleich zur Zellkontrolle nur schwach induziert (IL-10: 6- bis 8-fach erhöht bei beiden Spezies, MCP-1: 12-fach erhöht bei bovinen MDM) oder blieben unverändert (MCP-1 humane MDM). Die TGF- β mRNA-

¹ MW und SD aus 5 unabhängigen Versuchen

Ergebnisse

Konzentration zeigte bei beiden MDM-Kulturen über den Untersuchungszeitraum keine Veränderung auf.

Zwischen bovinen und humanen MDM wurden Unterschiede in der Transkription der Immunmediatoren deutlich. So reagierten humane MDM wesentlich intensiver auf die LPS-Stimulation als bovine MDM. Zudem zeigte sich, dass stimulierte humane MDM nicht in der Lage waren, iNOS zu exprimieren. Im Gegensatz dazu konnte bei bovinen MDM eine signifikant erhöhte Expression von iNOS (220-fach 1 d *p. i.*, $p = 0,001$) nachgewiesen werden. Die Gene mehrerer untersuchter Zytokine und Chemokine wurden in humanen MDM innerhalb der ersten 3 h nach der LPS-Stimulation vermehrt transkribiert. Danach fiel die Expressionsrate deutlich ab. Besonders auffällig war dies bei IL-12, wo nach einer erhöhten Expression nach 3 h ein signifikanter Abfall der Expressionsrate um das 55.000-fache ($p = 0,001$) folgte. Bovine MDM zeigten über den zeitlichen Verlauf mit Ausnahme von IL-10 keine Abnahme der Expression, sondern eine Zunahme der mRNA-Konzentration.

Bei der LPS-induzierten Reaktion in bovinen Alveolarmakrophagen dominierte ebenfalls nach einer Inkubation von 3 h die Expression von Th1-spezifischen Zytokinen, wie IL-1 β , IL-12 und TNF- α (Tabelle 11). Über den weiteren Untersuchungszeitraum nahm die mRNA-Konzentration von IL-1 β um das 54-fache zu, wohingegen die Menge von IL-12 und TNF- α stagnierte. Die Th2-spezifischen Zytokine IL-10 und TGF- β wurden durch die LPS-Behandlung kaum beeinflusst. Die Menge IL-10-spezifischer mRNA wies 3 h *p. s.* eine leichte Erhöhung auf, welche im weiteren Verlauf auf das Niveau einer Zellkontrolle abfiel. IFN- γ wurde in Folge der Stimulation vermehrt exprimiert und stieg über den Zeitraum von 24 h stetig an. Chemokine, wie IL-8, MCP-1 und RANTES, wurden durch LPS zeitlich spezifisch induziert. So nahm die mRNA-Konzentration von RANTES nach 3 h stark zu und fiel bis 1 d *p. s.* wiederum ab. IL-8 und MCP-1 wiesen dagegen erst 24 h *p. s.* eine deutliche Erhöhung im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle auf. Ähnlich wie bei bovinen Makrophagen konnte durch die LPS-Zugabe eine Zunahme von iNOS in Alveolarmakrophagen induziert werden. Die Reaktion der bovinen Alveolarmakrophagen auf LPS war im Vergleich zu bovinen MDM besonders in der Expression von Th1-spezifischen Zytokinen, wie IL-1 β und TNF- α , deutlich verzögert. Zudem zeigte sich, dass bovine MDM eine stärkere IL-12 und Alveolarmakrophagen eine erhöhte IL-1 β -mRNA-Synthese in Folge der Stimulation induzierten. Auffällig waren zudem die erheblichen Unterschiede in der IFN- γ -Expression zwischen den beiden bovinen Makrophagenkulturen. Bovinen MDM bildeten wesentlich geringere Mengen an IFN- γ -mRNA als Alveolarmakrophagen.

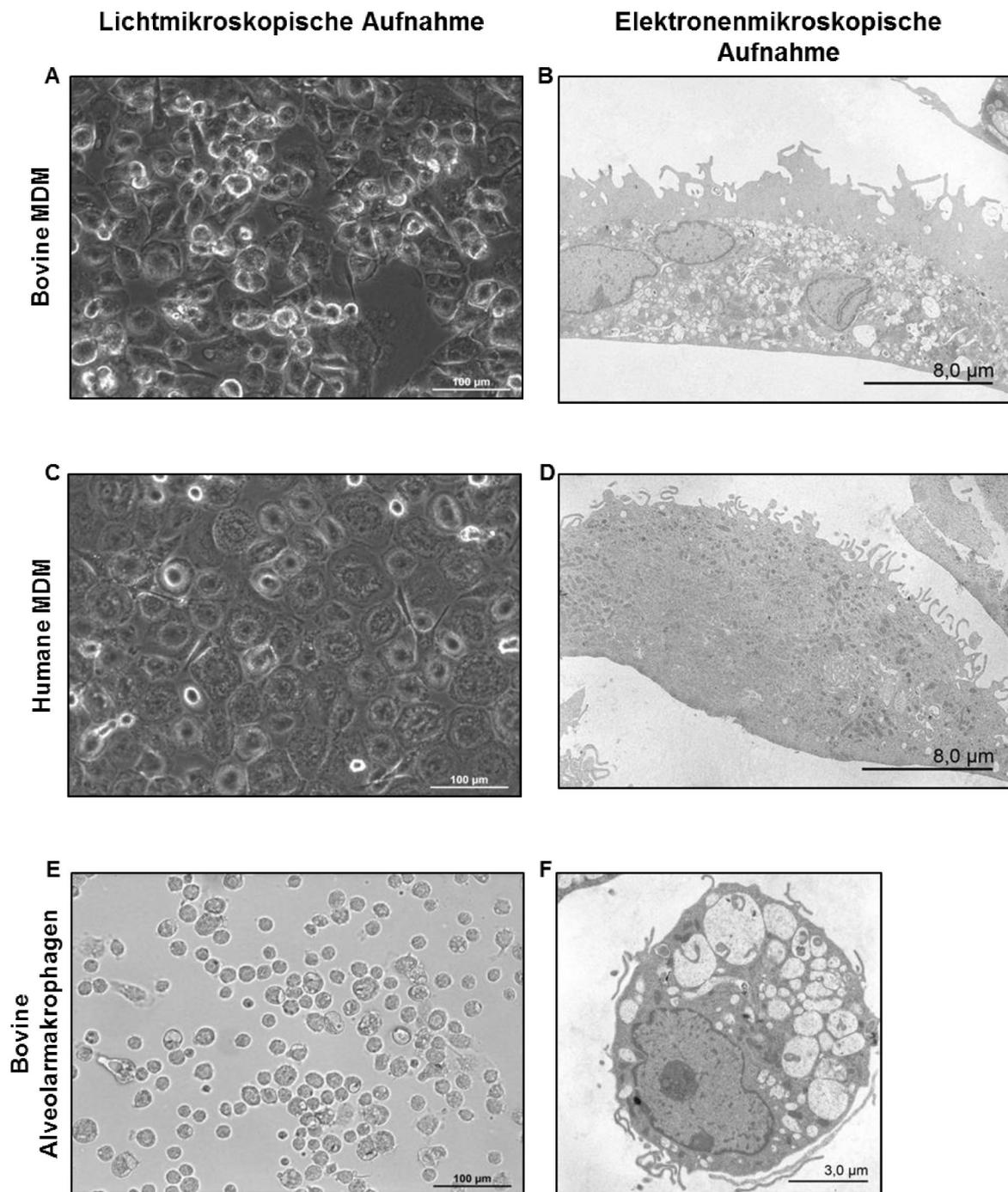


Abbildung 2: Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von Makrophagenkulturen.

Tabelle 11: LPS-bedingte Expression von Zytokin- und Chemokinen in humanen (hu) sowie bovinen (bo) MDM und Alveolarmakrophagen. Makrophagen wurden mit LPS (6 µg/ml) stimuliert. Die relative mRNA-Menge für verschiedene Zytokine sowie Chemokine wurde 3 h sowie 24 h *p. s.* mittels *real-time* PCR quantifiziert und auf die Expression des HKG normalisiert. Mit Hilfe eines Randomisierungstests wurden die Δ CT-Werte paarweise mit der Zellkontrolle in 3 unabhängigen Versuchen (SD siehe Tabelle 21) verglichen (signifikante Werte bezogen auf Zellkontrolle *kursiv* [$p \leq 0,05$] und bezogen auf den 3 h-Wert unterstrichen [$p \leq 0,05$] gekennzeichnet).

Zellen	Zeit [h p. s.]	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	IFN- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
hu MDM	3	636,5	385,5	6,4	54946,3	564,2	1,1	18,4	1,8	114,8	1,5
	24	<u>1,6</u>	4,6	<u>1,7</u>	<u>9,3</u>	<u>1,9</u>	1,0	<u>0,9</u>	2,2	8,2	0,7
bo MDM	3	330,4	18,7	8,7	248,0	83,6	1,0	5,3	12,5	28,6	33,7
	24	<u>927,7</u>	44,8	<u>2,0</u>	1654,3	<u>10,8</u>	<u>0,7</u>	28,6	12,3	27,4	219,6
bo Alveolar- makrophagen	3	34,3	3,0	10,6	523,4	18,5	0,9	43,8	7,1	89,1	24,0
	24	<u>1850,1</u>	34,6	<u>1,0</u>	<u>383,9</u>	<u>16,6</u>	<u>0,2</u>	<u>110,1</u>	104,3	47,0	283,5

<ZK =ZK >ZK

7.1.4 LPS-induzierte Expression von Makrophagen-Aktivierungsmarkern

Die Makrophagenkulturen wurden zusätzlich auf die Expression von oberflächenassoziierten Aktivierungsmarkern nach einer Stimulation mit *E. coli* LPS durchflusszytometrisch untersucht. Wie in Abbildung 3 dargestellt, zeigten sich nach einer Inkubation von 24 h vereinzelt Unterschiede in der Konzentration der Oberflächenproteine. So induzierte LPS bei bovinen MDM eine 2-fach erhöhte Expression von CD40 und CD80. Dagegen wurde bei humanen MDM eine 3,2-fach erhöhte Expression von CD40 und eine kaum zur Zellkontrolle veränderte CD80-Konzentration (1,6-fach) festgestellt. Die Oberflächenmarker CD86, MHC I und II blieben trotz Stimulation bei beiden Spezies zur Zellkontrolle unverändert (Abbildung 3 A). Keine wesentlichen Unterschiede konnten in Folge der LPS-Stimulation im Aktivierungsprofil zwischen bovinen MDM und Alveolarmakrophagen festgestellt werden (Abbildung 3 B).

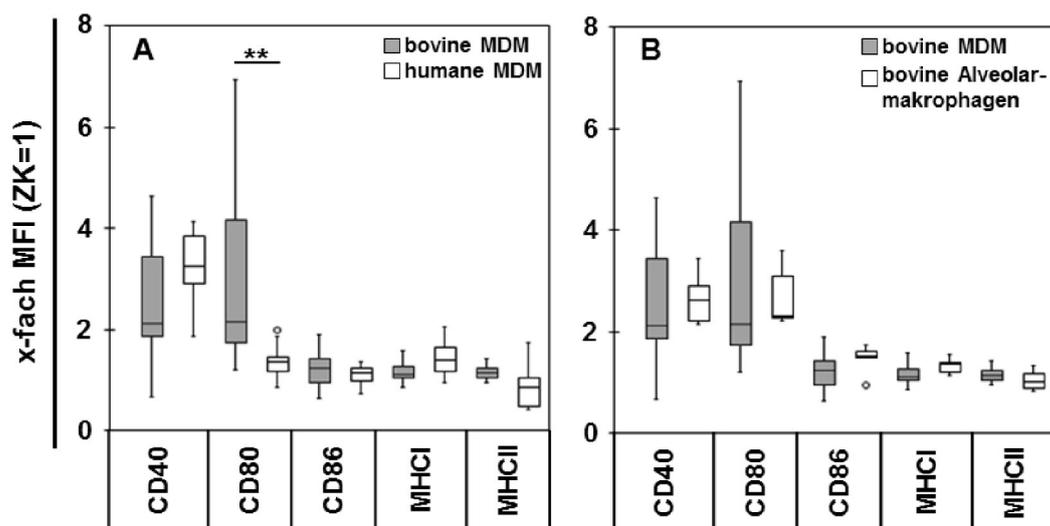


Abbildung 3: Expression von Aktivierungsmarkern auf Makrophagen nach einer LPS-Stimulation. Bovine und humane MDM sowie bovine Alveolarmakrophagen wurden mit 6 µg/ml *E. coli* LPS stimuliert und 24 h *p. s.* die Marker CD40, CD80, CD86 sowie MHC-Moleküle durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind Boxplots mit Werten aus unabhängigen Versuchen (bo MDM: n = 10, hu MDM: n = 6; bo Alveolarmakrophagen: n = 6). Statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *t*-Tests (**: $p \leq 0,01$). In **A** wurde die Expression der Aktivierungsmarker zwischen bovinen MDM und humanen MDM verglichen und in **B** zwischen bovinen MDM und bovinen Alveolarmakrophagen.

7.2 Charakterisierung der *C. b.*-Stämme

Für diese Arbeit wurden 13 *C. b.*-Stämme ausgewählt, welche sich hinsichtlich der Herkunft (Wirt), der Phase und den genetischen Eigenschaften (MLVA, Plasmidtyp, *adaA*-Gen) unterschieden (Tabelle 1). Bei den Isolaten handelte es sich neben den Referenzstämmen (Nm, H, D und S) vorrangig um Stämme von Wiederkäuern aus Deutschland. Acht Isolate stammten aus der Sammlung des IHIT (Gießen) und wurden in der Dissertation von Pablo H. Jiménez umfänglich charakterisiert (Jiménez 2012). Fünf deutsche Isolate wurden aus aktuellen *C. b.* Ausbrüchen (2010-2011) isoliert und im Rahmen des Verbundprojektes Q-Fieber-Verbund (gefördert durch das BMBF unter der Nummer TP 1.4) zur Verfügung gestellt.

7.2.1 Genetische Typisierung der *C. b.*-Stämme

Die Typisierung der Stämme wurde am IHT in Gießen durchgeführt.

7.2.1.1 Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA)

Die genomische Charakterisierung der *C. b.*-Stämme erfolgte mit Hilfe der MLVA-Analyse. Sieben verschiedenen Mikrosatelliten, sogenannte *tandem repeats*, wurden mit flankierenden *primern* amplifiziert und die Amplifikatlänge quantifiziert. Unterschiede in der Länge spiegelten die Anzahl der *tandem repeats* wieder, die eine Differenzierung der Stämme ermöglichten. Aus dem Dendrogramm in Abbildung 4 wird die resultierende Einordnung der *C. b.*-Stämme in die 4 MLVA-Gruppen ersichtlich. Von den ausgewählten Stämmen waren vier Isolate der Gruppe I (Cb 23/2, Cb 30/14, Cb 19/34, Z3464/92), zwei Isolate der Gruppe II (S, Z3055/91), drei Isolate der Gruppe III (D, Cb 71/3, Cb 98/2) und drei Isolate der Gruppe IV (Nml, NmII, H) zugeordnet. Für Z69/06 ergab die MLVA-Typisierung, dass es sich hierbei um kein reines Isolat sondern um ein Gemisch aus zwei *C. b.*-Stämmen der MLVA-Gruppe 3 und 4 handelte. Ob die Isolate beide aus der Milch vom Rind isoliert wurden oder eine Kontamination vorliegt, kann rückblickend nicht beurteilt werden.

Ergebnisse

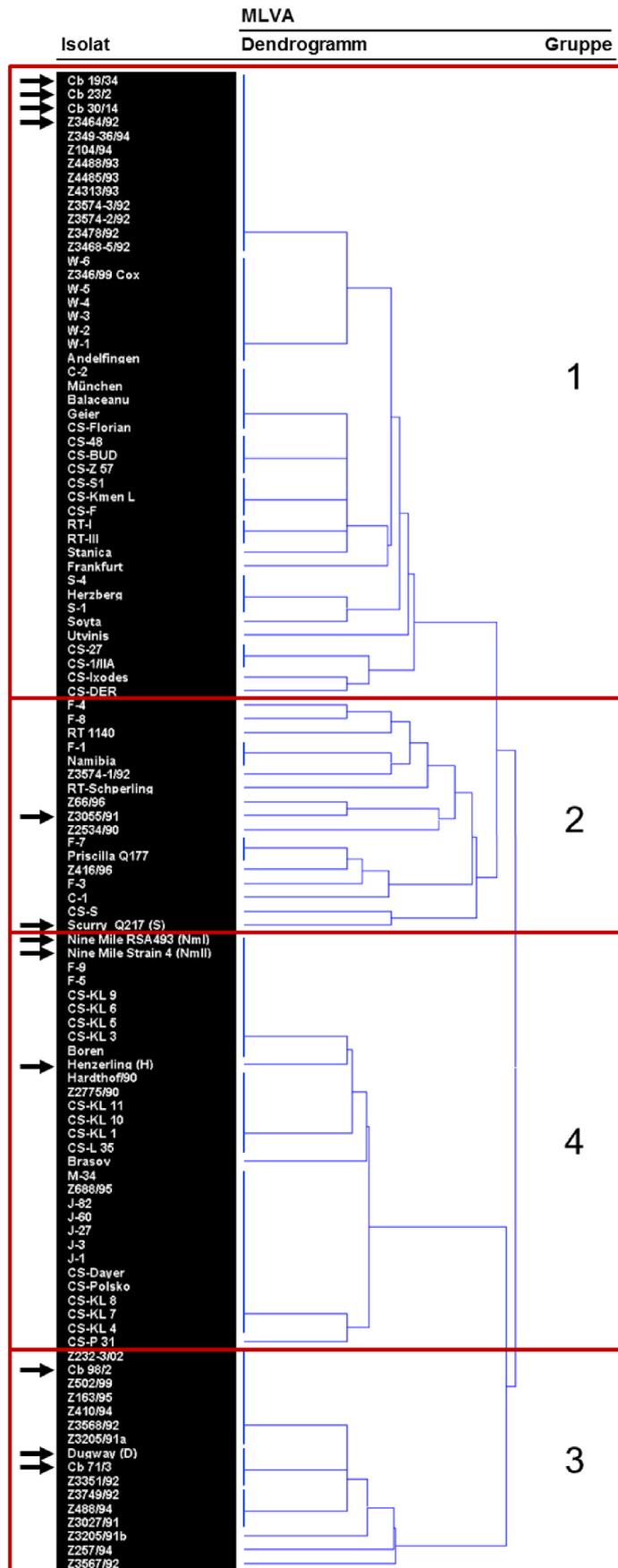


Abbildung 4: MLVA-Dendrogramm der untersuchten *C. b.*-Isolate. Die Pfeile markieren die für die MDM-Infektion ausgewählten Stämme. Das Dendrogramm wurde durch Dr. Carsten Heydel (IHIT) zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse

7.2.1.2 Plasmidtyp und *Acute disease antigen A (adaA)*-Gen

Für *C. b.* sind vier Plasmidtypen (QpH1, QpRS, QpDG und QpDV) und eine QpH1-ähnliche chromosomal integrierte Sequenz beschrieben (Maurin und Raoult 1999). Das Polypeptid *adaA* soll bei akuten Q-Fieberverläufen beim Menschen immundominierend wirken (Zhang et al. 2005). In der Multiplex-PCR zur Identifikation des Plasmidtyps und in der *adaA*-PCR verhielten sich die Isolate dieser Studie weitgehend einheitlich (Tabelle 12). Bis auf den humanen Stamm S (kein Plasmid, kein *adaA*) besaßen alle Isolate ein QpH1-Plasmid und ein *adaA*-Gen.

7.2.2 LPS-Phasen-Typisierung

Bei Coxiellen werden drei morphologische LPS-Formen unterschieden, deren Bildung mit der Virulenz des Stammes in Verbindung gebracht wird. So unterscheidet man virulente Phase I-Stämme, intermediäre Stämme und avirulente Phase II-Stämme (Hoover et al. 2002). Die Charakterisierung des Phasentyps erfolgte für die in der Arbeit verwendeten *C. b.*-Stämme. Für die Typisierung wurde das LPS nach einer Phenolextraktion mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung dargestellt. Dieses Verfahren erlaubt die Bewertung der Phasen in Gemischen, indem die Intensitäten der höhermolekularen Phase I- (10-20 kDa) und niedermolekularen Phase II-Banden (~5 kDa) verglichen werden. Eine eindeutige Phasenzuordnung gelang bei NmlI (Abbildung 5, Spur 3) und wurde für die Bewertung der anderen Stämme verwendet. Im Vergleich dazu konnte bei Isolat H (Abbildung 5, Spur 4) kein verkürztes LPS dargestellt werden. Es wurden zwei Banden zwischen 13 und 15 kDa detektiert, weshalb das LPS von Stamm H fast ausschließlich der Phase I zugeordnet werden konnte. Beim LPS von Stamm Nml wurden starke Banden bei 13-15 kDa (ähnlich wie Stamm H) sowie eine dünne Bande bei 5 kDa (ähnlich wie Stamm NmlI) nachgewiesen (Abbildung 5, Spur 2).

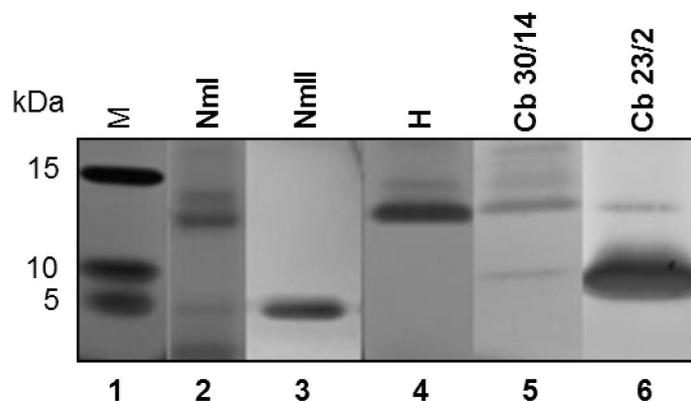


Abbildung 5: LPS-Phasen-Typisierung der *C. b.*-Stämme. Silberfärbung nach Auftrennung in der SDS-Page (20%) von LPS-Präparationen der Isolate Nml, NmlI, H, Cb 30/14 und Cb 23/2.

Ergebnisse

Die LPS-Ausstattung aller anderen Isolate stellten Phasengemische dar, bei denen die Phase I-Bande eine stärkere (Abbildung 5, Spur 5), ähnliche oder schwächere (Abbildung 5, Spur 6) Intensität aufwies, als die der Phase II. Die Bewertung der Stämme erfolgte an den beiden Referenzstämmen NmII und H. Die Bandenintensität wurde am Verhältnis der beiden Phasentypen abgeschätzt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Typisierung der *C. b.*-Isolate

<i>C. b.</i>-Stamm	genetische Eigenschaften			Phasentyp
	MLVA-Gruppe	Plasmid	adaA	
NmI	IV	QpH1	+	I ≈ II
NmII	IV	QpH1	+	II
H	IV	QpH1	+	I
S	II	plasmidlos	-	I > II
D	III	QpH1	+	I ≈ II
Z3055/91	II	QpH1	+	I < II
Z69/06	III + IV	QpH1	+	I < II
Cb 23/2	I	QpH1	+	I < II
Cb 71/3	III	QpH1	+	I < II
Cb 98/2	III	QpH1	+	I ≈ II
Cb 19/34	I	QpH1	+	I < II
Cb 30/14	I	QpH1	+	I > II
Z3464/92	I	QpH1	+	I ≈ II

7.2.3 Quantifizierung der Inokula

Coxiellen kommen in zwei Zustandsformen in der Umwelt vor: SCV (infektiöse extrazelluläre Form) und LCV (nicht infektiöse intrazelluläre Form) (Maurin und Raoult 1999). Die in der Arbeit verwendeten Inokulate der *C. b.*-Stämme wurden auf BGM kultiviert und während der stationären Wachstumsphase geerntet, in der die Umwandlung der metabolisch aktiven LCV in SCV erfolgt. Um die Zustandsform der Coxiellen in den Inokula zu charakterisieren, wurden die Bakterien mit Hilfe des Negativ-Kontrast-Verfahrens morphologisch beurteilt. Die Untersuchungen ergaben eine größtenteils einheitliche Morphologie mit typischen Kurzstäbchen, welche Klein- und Großzellvarianten beinhalteten (Tabelle 13). Die Bakterienlänge variierte zwischen 0,62 und 1,04 µm. Das Isolat H stellte durch seine pleomorphe Gestalt eine Ausnahme dar und wich mit einer Bakterienlänge von 1,04 µm deutlich von den anderen Stämmen ab.

Ergebnisse

Tabelle 13: Morphologie der *C. b.*-Stämme in den Inokulaten. *C. b.*-Stämme wurden mittels Negativ-Kontrast-Mikroskopie anhand ihrer Länge und Breite charakterisiert. Aufgeführt sind MW \pm SD von 11 bis 45 stichprobenartig beurteilte Einzelzellen pro Stamm.

<i>C. b.</i>-Stamm	Länge [μm]	Breite [μm]
Nml	0,78 \pm 0,2	0,27 \pm 0,06
NmII	0,74 \pm 0,22	0,33 \pm 0,07
H	1,04 \pm 0,33	0,37 \pm 0,08
S	0,71 \pm 0,21	0,32 \pm 0,03
D	0,69 \pm 0,1	0,25 \pm 0,06
Z3055/91	0,62 \pm 0,1	0,29 \pm 0,04
Z69/06	0,88 \pm 0,29	0,33 \pm 0,07
Cb 23/2	0,77 \pm 0,19	0,36 \pm 0,08
Cb 71/3	0,76 \pm 0,25	0,36 \pm 0,07
Cb 98/2	0,73 \pm 0,16	0,33 \pm 0,06
Cb 19/34	0,76 \pm 0,19	0,38 \pm 0,08
Cb 30/14	0,73 \pm 0,30	0,37 \pm 0,10
Z3464/92	0,64 \pm 0,19	0,27 \pm 0,09

7.3 Infizierbarkeit von bovinen MDM mit *C. b.*

In humanen und murinen Makrophagenmodellen konnte eine aktive Replikation von *C. b.* nachgewiesen werden (Shannon und Heinzen 2008, Brennan et al. 2004). Die Infizierbarkeit von mononukleären Zellen der Wiederkäuer, welche die Hauptquelle für die Übertragung für den Menschen darstellen, wurde noch nicht belegt.

7.3.1 Etablierung eines *In vitro*-Infektionsmodells mit bovinen MDM

Bovine MDM wurden mit dem Referenzstamm Nml unter mehreren Bedingungen - Variation der Infektionsdosis (100 MOI, 200 MOI) und Inokulationsdauer (1 h, 2 h und 24 h) - inokuliert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen lichtmikroskopisch untersucht und der intrazelluläre Coxiellen-Titer mittels KID₅₀-Bestimmung ermittelt. Die Morphologie der Makrophagen veränderte sich über den Untersuchungszeitraum. So bildeten die Zellen randständig kleine PV's aus, die im Laufe der Inkubation an Größe zunahmten (Abbildung 6 B). Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung konnten die Coxiellen in den PV's wahrgenommen werden. In Vakuolen von nicht infizierten Zellen waren vergleichbare Strukturen nicht erkennbar. Infizierte Zellen bildeten zudem vermehrt dünne Pseudopodien aus, die als ein Saum auf der Zelloberfläche zu erkennen waren.

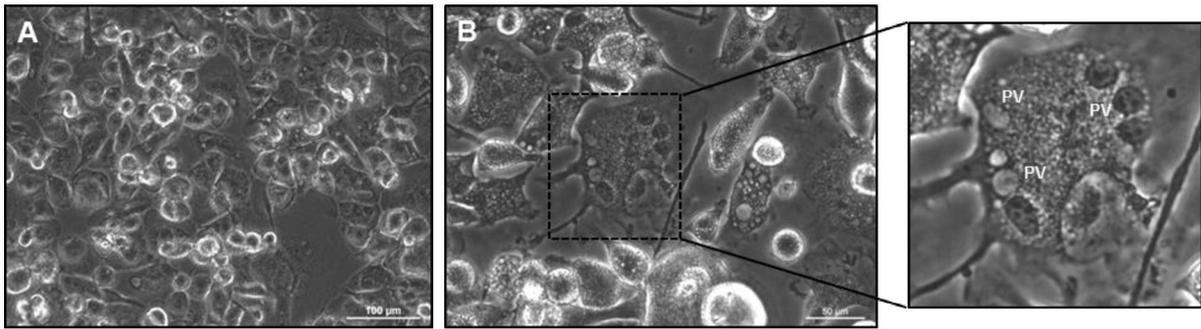


Abbildung 6. Nml-Infektion in bovinen MDM. Bovine MDM wurden mit Nml (100 MOI) infiziert und 7 d *p. i.* lichtmikroskopisch im Vergleich zur Zellkontrolle (**A**) beurteilt. Die randständigen parasitophoren Vakuolen (PV) wurden in den Nml-infizierten Kulturen (**B**) deutlich. (200 x Vergrößerung).

Eine Inokulation mit 100 und 200 MOI für eine Dauer von 24 h führte zu starken morphologischen Veränderungen der MDM innerhalb von 3 bis 7 d *p. i.* So konnte eine Zunahme der Granularität, ein vermehrtes Auflösen der Zellwandstrukturen und ein Ablösen der Zellen von der Gefäßoberfläche beobachtet werden. Aufgrund der morphologischen Veränderungen stellte sich diese Infektionsstrategie als keine geeignete Methode für einen Untersuchungszeitraum von 14 d dar. Neben der morphologischen Begutachtung wurde der KID_{50} -Wert der Kulturen in zwei unabhängigen Versuchen bestimmt (Abbildung 7). Die Retitration der Bakterien erfolgte 7 d *p. i.* Dabei konnten keine erheblichen Unterschiede im KID_{50} -Wert zwischen der Infektionsdosis bzw. Inokulationsdauer festgestellt werden. Bei einer Infektion mit einer konstanten Inokulationsdauer und einer variierenden Infektionsdosis (100 MOI zu 200 MOI) stiegen die KID_{50} -Werte nur geringfügig an (1 h: 53 %; 2 h: 26 %). Dagegen erhöhte sich bei einer variierenden Inokulationszeit (1 h zu 2 h) unter einer gleichbleibenden Infektionsdosis (100 MOI oder 200 MOI) die bakterielle Lebendkeimzahl bei 100 MOI um 73 % und 200 MOI um 24 %. Da die untersuchten Infektionsmodelle kaum Unterschiede in der Morphologie sowie in der Bestimmung der KID_{50} -Werte ergaben, wurde für weitere funktionelle Untersuchungen ein Infektionsschema mit 100 MOI für 1 h gewählt.

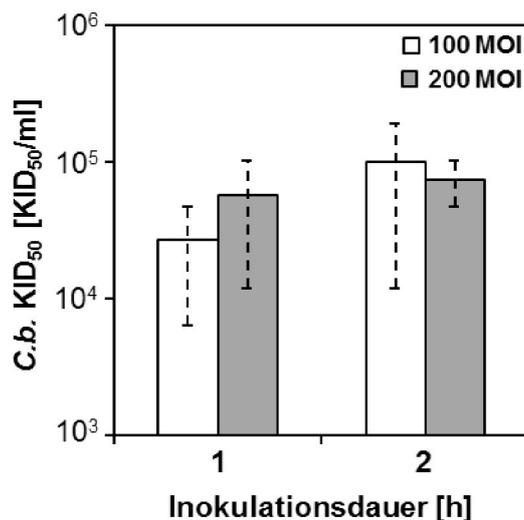


Abbildung 7: Invasion von *C. b.* in bovine MDM. Bovine MDM wurden mit verschiedenen Inokulationsdosen (100 und 200 MOI) für 1 oder 2 h inokuliert und die Lebendkeimzahl (KID₅₀) 7 d *p. i.* bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von zwei unabhängigen Versuchen.

7.3.2 Replikationskinetik von Nml in bovinen MDM

Da bislang keine Studien über das Replikationsverhalten von Coxiellen in bovinen Makrophagen publiziert sind, wurde nach der Bestätigung der Infizierbarkeit (6.3.1) eine Replikationskinetik von Nml (100 MOI, 1 h Inokulation) erstellt. Wie in Abbildung 8 dargestellt, erfolgte anhand des gewählten Startpunktes (0 h *p. i.*) eine Bestimmung der intrazellulären Lebendkeimzahl nach verschiedenen Zeitpunkten über eine Dauer von 14 Tagen. Die Wachstumskurve entsprach einem typischen einstufigen Vermehrungszyklus. Am Anfang der Infektion lag die applizierte Bakteriensuspension im Zellüberstand vor. Innerhalb der einstündigen Inokulation kam es zur Adaption von *C. b.* an die Wirtszelle, wobei keine Aussage über die gebundene Bakterienmenge getroffen werden konnte. Dem folgte die Penetration und die anschließende *lag*- oder Anlauf-Phase, welche sich über 3 Tage erstreckte und mit einem Abfall der KID₅₀-Werte einherging. Nach 4 d *p. i.* stieg die Coxiellenkonzentration deutlich an und erreichte innerhalb der exponentiellen Phase einer Erhöhung von zwei log-Stufen. In diesem Zeitraum kommt es zu einer vermehrten Teilung der metabolisch aktiven LCV mit einer Verdopplungszeit von 25,7 h. Etwa 11 d *p. i.* flachte der Anstieg der Wachstumskurve allmählich ab. Eine stationäre Phase konnte innerhalb des Untersuchungszeitraums nicht nachgewiesen werden.

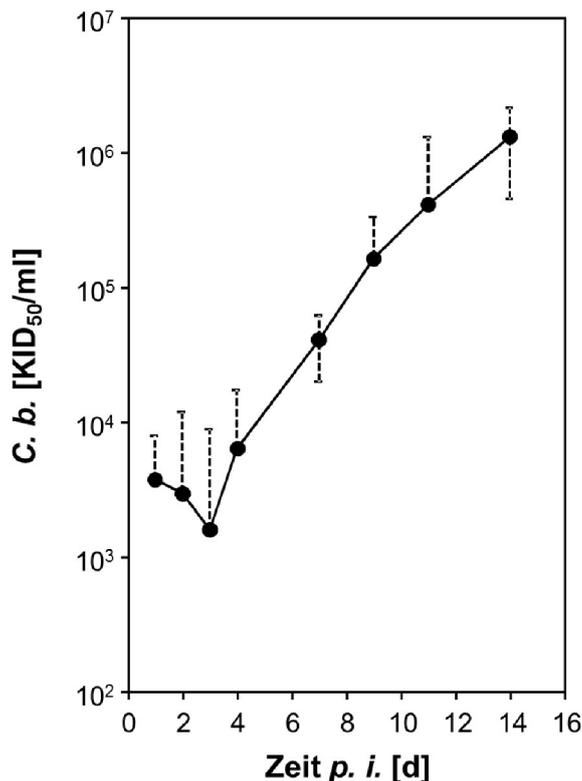


Abbildung 8: Replikationskinetik von Nml in bovinen MDM. Bovine MDM wurden mit Nml (100 MOI, 1 h) infiziert und die Lebendkeimzahl (KID₅₀) nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dargestellt sind MW ± SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

7.4 Replikation verschiedener *C. b.*-Stämme in Makrophagenkulturen

Die Replikation von 13 *C. b.*-Stämmen (Tabelle 1) wurde in bovinen und humanen MDM vergleichend untersucht. Für die Aufnahme einer Kinetik wurden die Zellen mit den verschiedenen *C. b.*-Stämmen (100 MOI für 1 h) infiziert und nach 1, 7 und 14 d *p. i.* eine Probe für die Bestimmung der Bakterienmenge genommen. Neben den MDM wurden zudem bovine Alveolarmakrophagen mit einer Auswahl an *C. b.*-Stämmen inokuliert.

7.4.1 Replikationsverhalten verschiedener *C. b.*-Stämme in bovinen MDM

In bovinen MDM konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum von 14 Tagen eine Replikation von *C. b.* nachgewiesen werden. Diese variierte deutlich zwischen den einzelnen Stämmen (Abbildung 9). Bei den Referenzstämmen Nml, H und S konnte ein deutlicher Anstieg der Lebendkeimzahl um 2 bis 2,5 log-Stufen festgestellt werden. Der bakterielle Titer von Stamm D dagegen veränderte sich in den bovinen Kulturen über den Zeitraum nicht. Isolate aus aktuellen Ausbruchsgeschehen (2010-2011) wiesen nur einen schwachen Anstieg der Keimzahl auf.

Zusätzlich zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde die Bakterienkonzentration der infizierten bovinen MDM mit Hilfe einer *C. b.*-spezifischen *real-time* PCR quantifiziert. Die hier

Ergebnisse

bestimmte genomische Kopienzahl (Genomäquivalente; *genome equivalents*: GE) setzt sich aus den Genkopien der lebenden und toten Bakterien zusammen. Wie in Abbildung 10 dargestellt, konnten ähnliche Replikationsverläufe wie mit der Lebendkeimbestimmung gezeigt werden. Besonders der Stamm S wies einen signifikanten Zuwachs der Genomkopien über einen Zeitraum von 14 Tagen auf ($p < 0,0001$). Andere Stämme, wie Nml und H, zeigten dagegen nur einen minimalen Anstieg der GE auf, welche nur bedingt mit den Ergebnissen der Lebendkeimbestimmung korrelierten. Die GE vom bovinen Isolat Z69/06 stiegen über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant an ($p < 0,0001$), was so in der Lebendkeimbestimmung nicht deutlich wurde. Stämme aus aktuellen Ausbrüchen sowie das Isolat D wiesen keinen oder einen geringen Zuwachs der GE auf, welches die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmung verifiziert.

7.4.2 Replikation verschiedener *C. b.*-Stämme in humanen MDM

In humanen MDM replizierten die untersuchten Stämme mit einer individuellen Effizienz (Abbildung 11). Mit Ausnahme des Isolats D vermehrten sich die Isolate im Untersuchungsraum mit einem Anstieg der Lebendkeimzahl um bis zu 4,5 log-Stufen. Besonders die Referenzstämme Nml, NmII, H, S sowie die Feldisolate Z3055, Z69/06 und Cb 30/14 wiesen einen deutlichen Anstieg der Lebendkeimzahl mit einem Zuwachs von 2 bis 4,5 log-Stufen auf. Die übrigen Stämme replizierten erkennbar geringer. Der Anstieg der Keimzahl lag bei 1 bis 1,5 log-Stufen. Der Stamm D vermehrte sich nur mit einem minimalen Zuwachs von 0,5 log-Stufen.

Die Quantifizierung der GE zeigte ebenfalls stammspezifische Replikationsverläufe (Abbildung 12), die annähernd mit den Ergebnissen der Lebendkeimbestimmung übereinstimmten. Die Referenzstämme Nml, NmII, H, Z69/06 und S wiesen einen signifikanten Zuwachs von 3 bis 4 log-Stufen über den gesamten Untersuchungszeitraum auf. Auffällig war, dass die Isolate NmII und H einen Anstieg der Genomäquivalente erst ab dem 7. Tag nach der Infektion verzeichneten, was nicht mit den Beobachtungen der Lebendkeimbestimmungen einherging. *C. b.*-Stämme aus aktuellen Ausbrüchen, wie Cb 23/2, Cb 71/3 und Cb 98/2, wiesen im Gegensatz zur Entwicklung der Lebendkeimzahl in der GE-Quantifizierung einen Rückgang bzw. eine Stagnation des bakteriellen Wachstums auf.

Ergebnisse

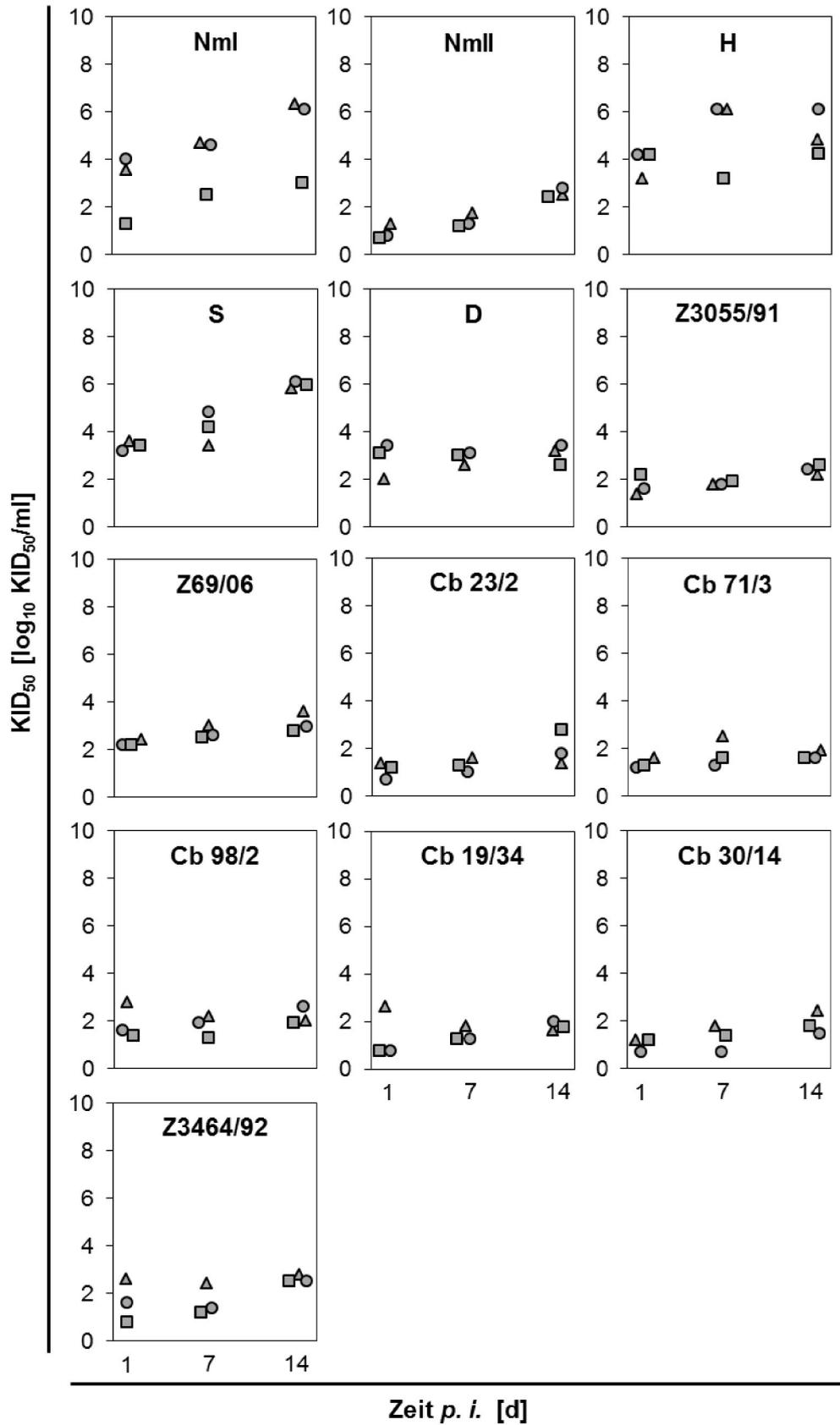


Abbildung 9: Replikation von *C. b.*-Stämmen in bovines MDM. Bovine MDM wurden mit verschiedenen *C. b.*-Stämmen (100 MOI, 1 h) infiziert und die Lebendkeimzahl (KID₅₀) nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dargestellt sind Werte aus 3 unabhängigen Versuchen.

Ergebnisse

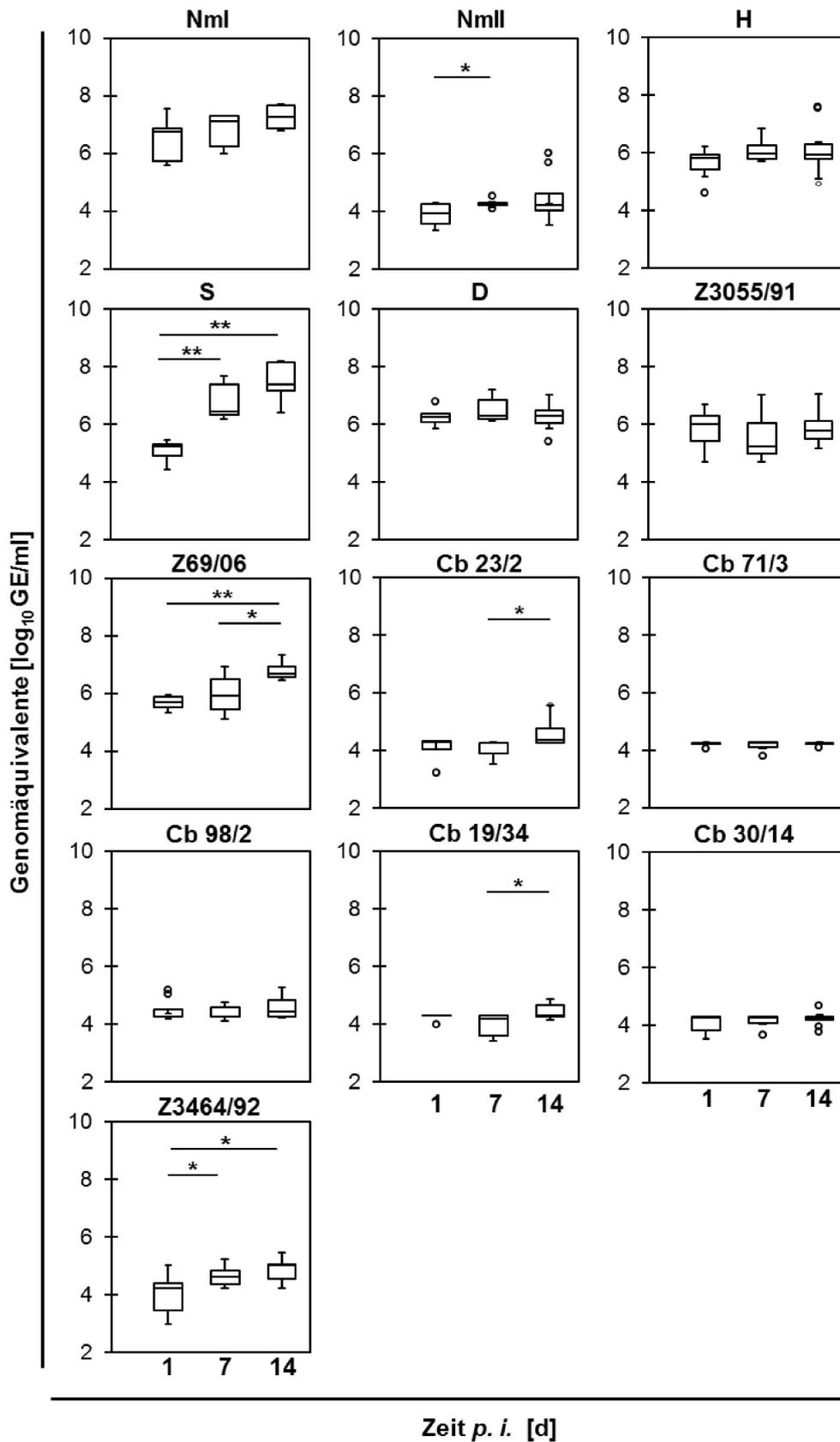


Abbildung 10: Replikation von *C. b.*-Stämmen in bovinen MDM. Bovine MDM wurden mit verschiedenen *C. b.*-Stämmen (100 MOI, 1 h) infiziert und Genomäquivalente mittels *real-time* PCR bestimmt. Dargestellt sind Boxblots mit Werten aus 3 oder 4 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 technischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *t*-Test (**: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$).

Ergebnisse

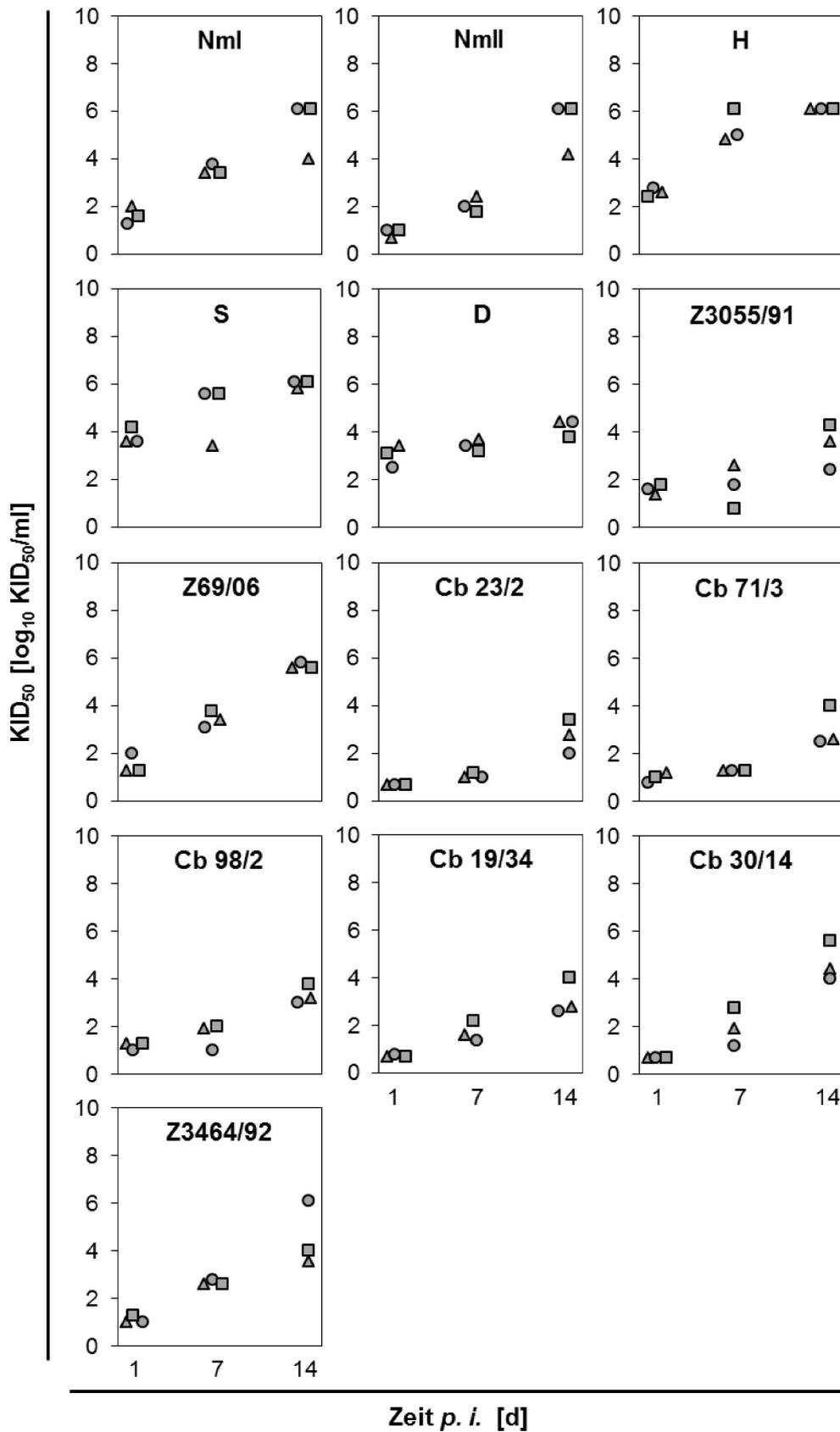


Abbildung 11: Replikation von *C. b.*-Stämmen in humanen MDM. Humane MDM wurden mit verschiedenen *C. b.*-Stämmen (100 MOI, 1 h) infiziert und die Lebendkeimzahl (KID_{50}) nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dargestellt sind Werte aus 3 unabhängigen Versuchen.

Ergebnisse

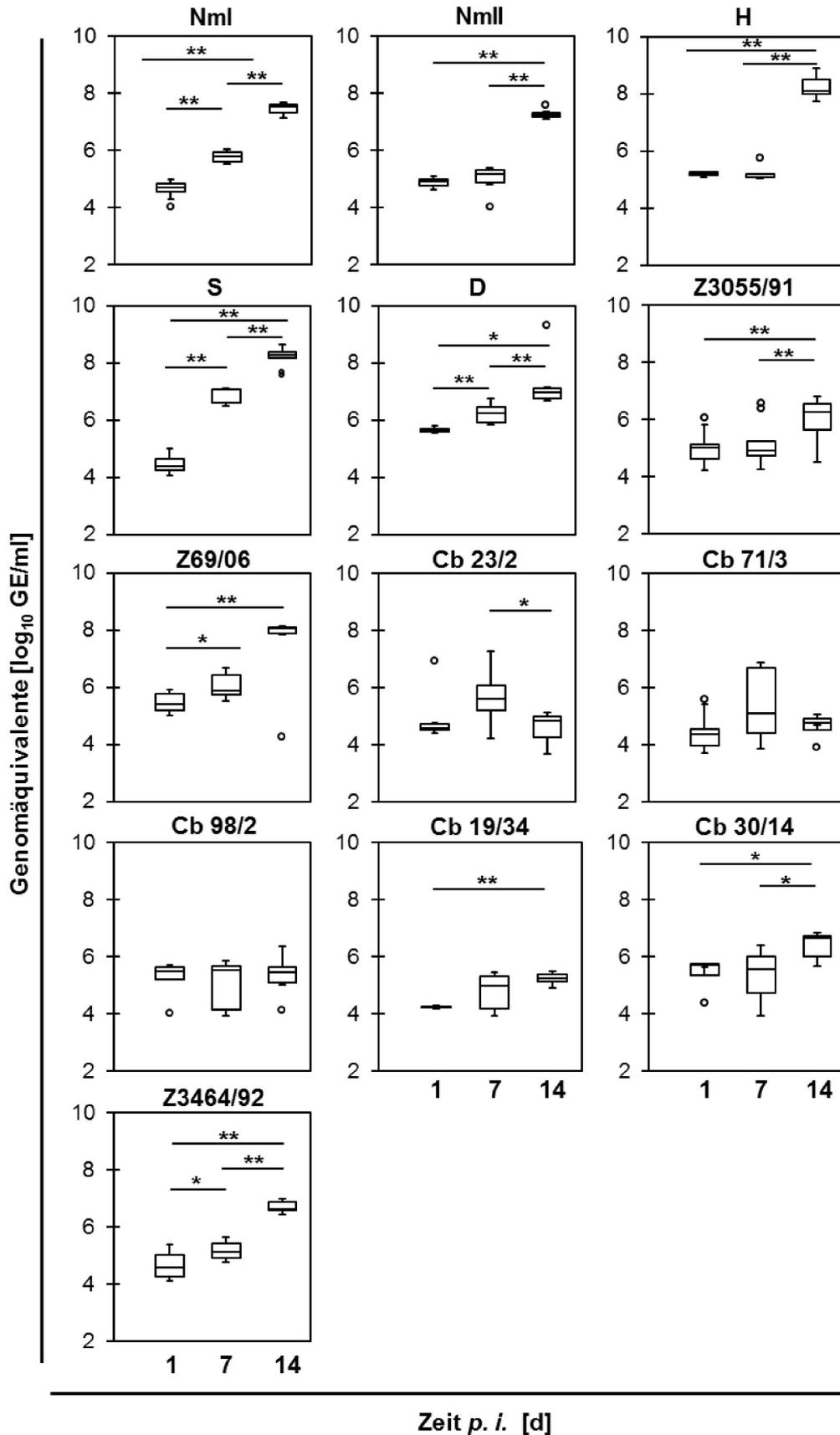


Abbildung 12: Replikation von *C. b.*-Stämmen in humanen MDM. Humane MDM wurden mit verschiedenen *C. b.*-Stämmen (100 MOI, 1 h) infiziert und Genomäquivalente mit Hilfe einer *icd* real-time PCR bestimmt. Dargestellt sind Boxblots mit Werten aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 technischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *t*-Test (**: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$).

7.4.3 Vergleichende Analysen der Replikation in bovinen und humanen MDM

Um die Replikation der einzelnen *C. b.*-Stämme zu bewerten, wurden verschiedene Ansätze für die vergleichende Analyse zwischen bovinen und humanen MDM gewählt. Für einen Einzelstamm-Vergleich wurde ein Replikationsfaktor gebildet. Die Berechnung des Faktors erfolgte aus der Lebendkeimzahl an Tag 14 *p. i.* im Vergleich zu Tag 1 *p. i.* und ist in Abbildung 13 dargestellt. Der Replikationsfaktor der Stämme differenzierte zwischen den Wirtszellspezies signifikant ($p = 0,0001$). So replizierten bis auf Stamm S alle *C. b.*-Stämme in humanen MDM effizienter als in bovinen MDM. Um das Wachstumsverhalten der Stämme unabhängig von der Wirtszellspezies zu beurteilen, wurde der Replikationsfaktor in Korrelation mit den charakteristischen Eigenschaften der *C. b.*-Stämme gesetzt (Abbildung 14). Dabei zeigten sich Unterschiede im Replikationsverhalten der einzelnen Stämme auf. In bovinen MDM beeinflusste vor allem der LPS-Phasentyp die Replikationsfähigkeit der Bakterien. *C. b.*-Stämme (zumeist Phasengemische) mit einem verhältnismäßig hohen Anteil an Phase II-LPS replizierten in bovinen MDM deutlich langsamer als Isolate mit einem höheren Anteil an Phase I-LPS. In humanen MDM schien der LPS-Phasentyp kaum die Replikation der Bakterien zu beeinflussen. Coxiellen mit einem höheren Anteil an Phase I-LPS replizierten mit einer fast gleichen Effizienz wie Isolate mit einem Überschuss an Phase II-LPS. Eine Ausnahme stellten die beiden Isolate H und NmII dar, welche fast ausschließlich Phase I- bzw. II-LPS bilden. So replizierte der Stamm H mit einem Replikationsfaktor von 3,51 deutlich langsamer als NmII mit 4,58. Neben dem LPS-Phasentyp wurde das Replikationsverhalten der Stämme auch der Isolationsspezies gegenübergestellt. In bovinen MDM replizierten vor allem humane Isolate sowie der Zecken-Stamm NmI mit einer erhöhten Effizienz. Dagegen wiesen Isolate aus Wiederkäuern (Rind, Schaf, Ziege) eine deutlich reduzierte Replikation auf. Umgekehrt replizierten Wiederkäuer-Isolate, besonders die ovinen Stämme (Z3055/91 und Cb 30/14), in humanen MDM bis zu 50 % effizienter als die humanen Isolate H und S. Das einzige Nager-Isolat D vermehrte sich sowohl in bovinen als auch humanen MDM mit einer sehr geringen Wachstumseffizienz.

In beiden MDM-Kulturen wiesen die Isolate zudem eine genotypabhängige Replikationseffizienz auf. Stämme mit dem MLVA-Typ III replizierten in bovinen MDM mit einer sehr geringen, Isolate des MLVA-Typs I mit einer mäßigen und Isolate des MLVA-Typs IV mit einer verhältnismäßigen hohen Effizienz. Der genetische Einfluss wurde besonders deutlich bei Stämmen, die der MLVA-Gruppe II zugeordnet sind. So replizierte das Isolat S, welches als einziger Stamm kein Plasmid und kein *adaA*-Gen aufweist, 3,8-fach effizienter als das Isolat Z3055/91 ($p = 0,001$). In humanen MDM konnte ein ähnliches Muster zwischen der Replikation und dem MLVA-Typ festgestellt werden. So replizierten die Stämme des MLVA-Typs III mit einer sehr geringen, der MLVA-Typen I sowie II mit einer mäßigen und MLVA-Typ IV mit einer hohen Effizienz.

Ergebnisse

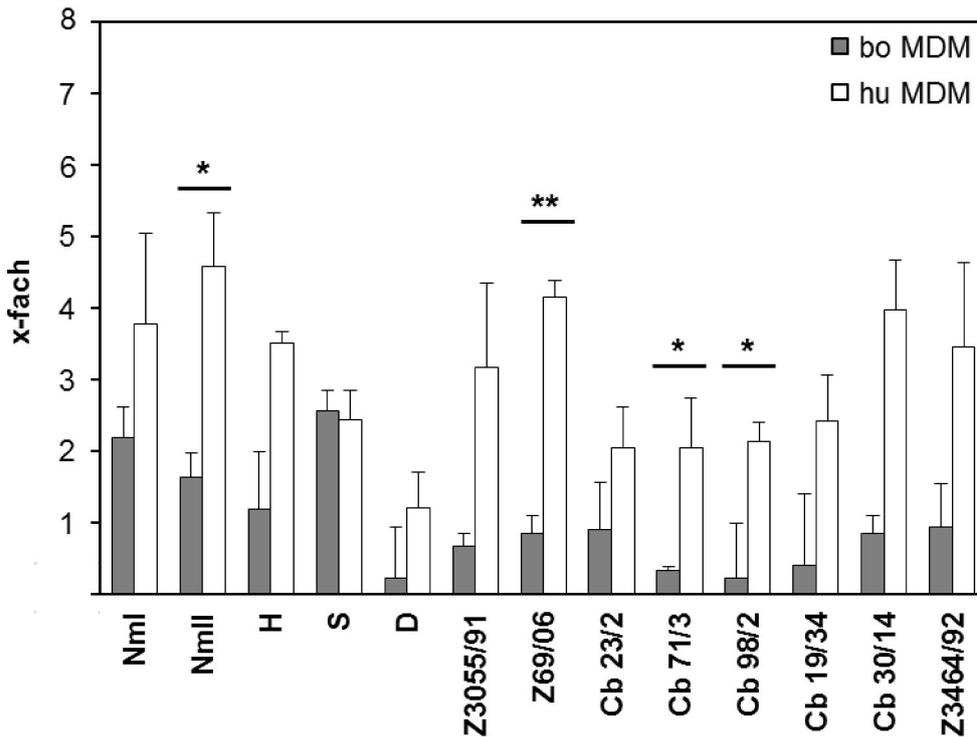


Abbildung 13: Replikationsrate der *C. b.*-Stämme in bovinen und humanen MDM. Ein Replikationsfaktor wurde anhand der an den Tagen 1 und 14 *p. i.* ermittelten Lebendkeimzahlen (KID_{50}) berechnet. Dargestellt sind MW und SD von jeweils 3 unabhängigen Versuchen. Statistik: Multivariante Analyse mit Greenhouse Geißer-Korrektur [* : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$].

Zusätzlich zum Replikationsfaktor wurde von allen Stämmen in den jeweiligen Spezies eine Regressionsanalyse erstellt, bei der die Entwicklung der Lebendkeimzahl im zeitlichen Verlauf erfasst wurde. Der Anstieg der errechneten Regressionsgeraden sowie der Pearson-Korrelationskoeffizient (r) verdeutlichten den stamm- und speziesspezifischen Bezug (Tabelle 14). Besonders der Pearson-Korrelationskoeffizient spiegelte durch die Bestimmung der Linearität das Wachstum der *C. b.*-Stämme wider. Dabei beschreibt ein Wert zwischen 0 und 1 eine positive Korrelation, ein Wert zwischen 0 und -1 eine negative Korrelation, keine nachweisbare Korrelation ist bei einem Wert von 0 gegeben. Bei bovinen MDM war der r -Wert stammabhängig. So gab es bei den Stämmen D und verschiedenen Feldisolaten (Cb 71/3, Cb 98/2, Cb 19/34) einen schwachen bzw. mäßigen und bei den Stämmen NmII, S sowie Z69/06 eine hohe Linearität. In humanen MDM zeigten alle Stämme einen hohen bis sehr hohen linearen Zusammenhang zwischen der Zeit und den Lebendkeimzahlen auf. Die beobachteten Unterschiede im Replikationsverhalten könnten mit der Invasivität der Bakterien zusammenhängen. Anhand der Regressionsgeraden konnte ein theoretischer Wert für die adhärenente Menge der Bakterien 1 h nach Inokulation berechnet werden.

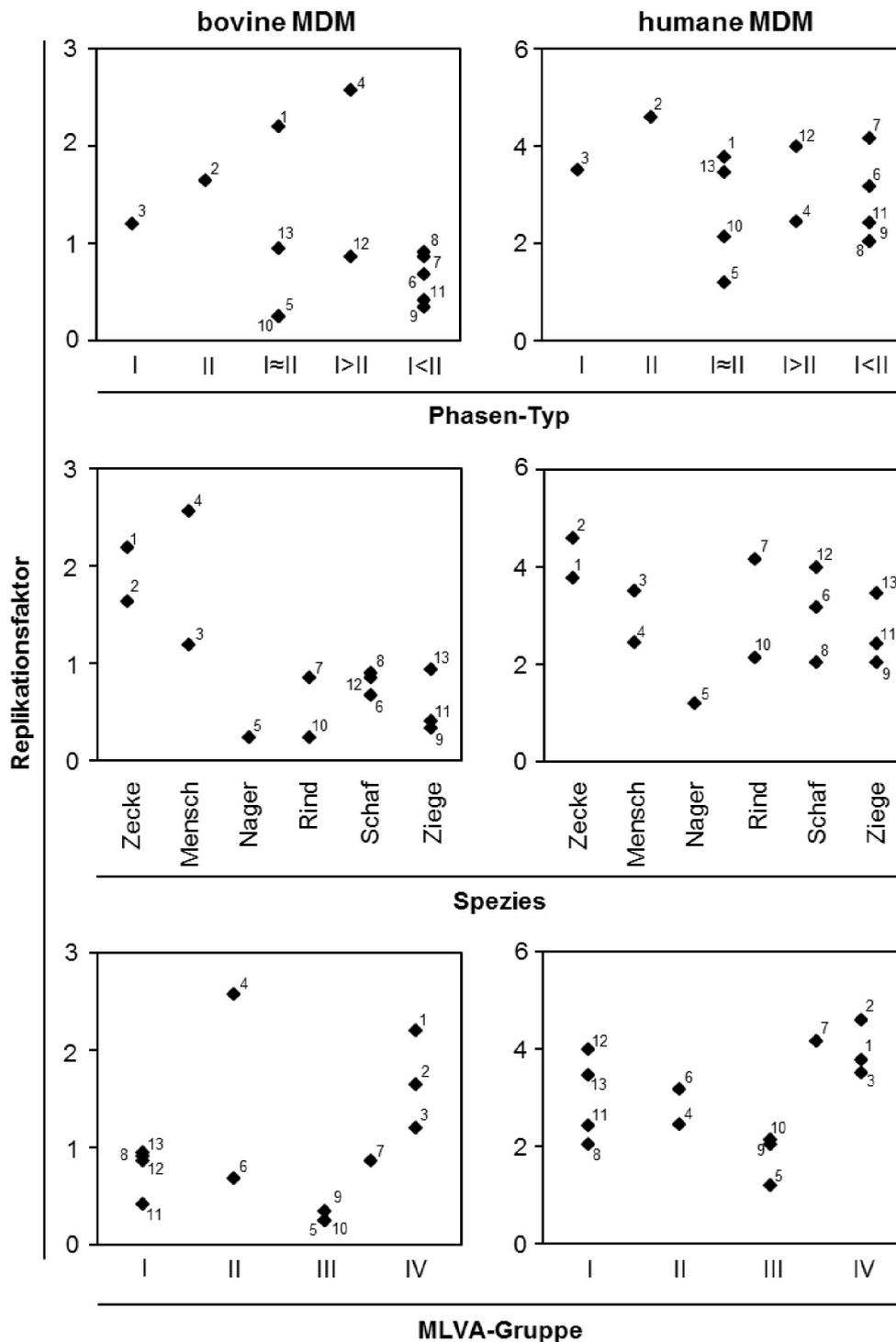


Abbildung 14: Korrelationsanalyse der Replikation von *C. b.* in bovinen und humanen MDM. Dargestellt sind Punktdiagramme des Replikationsfaktors von 13 verschiedenen *C. b.*-Stämmen (1 = NmI, 2 = NmII, 3 = H, 4 = S, 5 = D, 6 = Z3055/91, 7 = Z69/06; 8 = Cb 23/2; 9 = Cb 71/3, 10 = Cb 98/2, 11 = Cb 19/34, 12 = Cb 30/14, 13 = Z3464/92) gegenüber den bakteriellen Eigenschaften, wie LPS-Phasentyp, Herkunft und MLVA-Gruppe. Der Replikationsfaktor wurde aus den Werten von 3 unabhängigen Versuchen pro Stamm errechnet.

Ergebnisse

Tabelle 14: Regressionsanalysen zur *C. b.*-Replikation in bovinen und humanen MDM. Die Korrelation der Lebendkeimzahl im zeitlichen Verlauf wurde anhand einer exponentiellen Regressionsanalyse bestimmt. Dargestellt sind für bovine (**bo**) und humane (**hu**) MDM der Anstieg der Regressionsgeraden (**m**), der Pearson-Korrelationskoeffizient (**r**), sowie ein aus der Geradengleichung hervorgehender theoretischer Anfangswert der Kinetik zum Zeitpunkt 1 h *p. i.* (**t_{1h-theo}**).

<i>C. b.</i> -Stamm	Anstieg m		r		t _{1h-theo} [KID ₅₀ /ml]	
	bo	hu	bo	hu	bo	hu
Nml	0,25	0,27	0,58	0,93	353	31
NmII	0,13	0,32	0,93	0,94	5	2
H	0,13	0,28	0,52	0,92	8621	505
S	0,19	0,19	0,93	0,91	1185	3961
D	0,03	0,11	0,22	0,85	571	681
Z3055/91	0,04	0,25	0,76	0,80	44	6
Z69/06	0,08	0,32	0,82	0,99	153	17
Cb 23/2	0,04	0,13	0,67	0,89	11	3
Cb 71/3	0,03	0,12	0,35	0,86	27	6
Cb 98/2	0,03	0,14	0,21	0,90	65	8
Cb 19/34	0,03	0,15	0,30	0,92	22	4
Cb 30/14	0,07	0,27	0,68	0,94	8	2
Z3464/92	0,07	0,29	0,57	0,91	28	6

Die berechneten Werte für die adhärenierten Bakterien 1 h nach der Infektion variierten stark (Tabelle 14). Es wurden Lebendkeimzahlen bestimmt, die von 2 bis maximal 8.621 KID₅₀/ml schwankten. Auffällig war, dass die Invasion vor allem stammspezifisch war und weniger durch die Wirtsspezies der Zellkulturen bedingt wurde.

Um weitere Unterschiede zwischen den *C. b.*-Stämmen zu finden, wurde die Invasivität in Bezug auf die Eigenschaften der jeweiligen Stämme bezogen (Abbildung 15). Der Phasentyp wird in der Literatur als einer der Hauptfaktoren für die Invasivität der Bakterien beschrieben (Capo et al. 1999b). In den bovinen und humanen MDM zeigte sich, dass das Isolat H (Phase I-Isolat) effizienter von der Zelle aufgenommen wurde als das Phase II-Isolat NmII. Die Invasivität der Stämme mit einem Überschuss an Phase II-Partikeln ergab bei beiden Wirtszellspezies eine im Vergleich zu NmII erhöhte Aufnahme-Effizienz. Bei Stämmen mit einer erhöhten Konzentration an Phase I-Partikeln konnte sowohl eine starke Aufnahme von Stamm S als auch eine schwache bei Isolat Cb 30/14 beobachtet werden. Einen Zusammenhang zwischen der Adhärenz und der Herkunftsspezies wurde ebenfalls sichtbar (Abbildung 15). Humane Stämme (H, S) und das Nager-Isolat D wiesen bei bovinen als auch humanen MDM eine besonders starke Adhäsion auf. Dagegen wurden Wiederkäuerisolate von MDM beider Wirtsspezies nur gering aufgenommen. Einen eindeutigen Bezug zwischen der Invasivität und dem Genotypen der *C. b.*-Stämme konnte nicht abgeleitet werden. Stämme der MLVA-Gruppe I invadierten sowohl in bovine als auch in humane MDM mit der geringsten Effizienz. Bei den anderen Genotypen konnte keine eindeutige Gruppierung festgestellt werden.

Ergebnisse

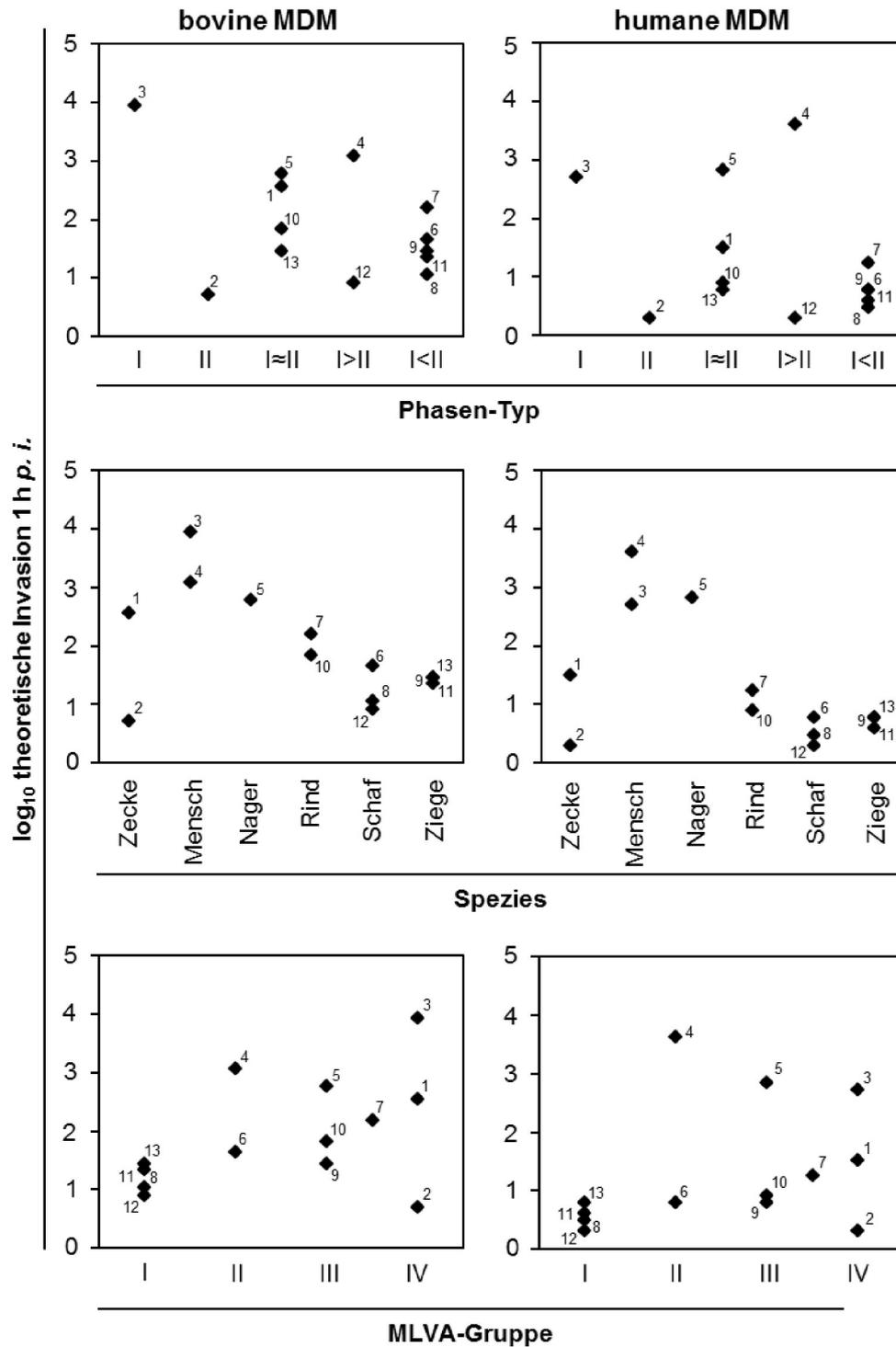


Abbildung 15: Korrelationsanalyse der Invasion von *C. b.* in bovinen und humanen MDM. Dargestellt sind Punktdiagramme des theoretische Invasion 1 h p. i. von 13 verschiedenen *C. b.*-Stämmen (1 = NmI, 2 = NmII, 3 = H, 4 = S, 5 = D, 6 = Z3055/91, 7 = Z69/06; 8 = Cb 23/2; 9 = Cb 71/3, 10 = Cb 98/2, 11 = Cb 19/34, 12 = Cb 30/14, 13 = Z3464/92) gegenüber den bakteriellen Eigenschaften, wie LPS-Phasentyp, Herkunft und MLVA-Gruppe. Die Invasion wurde anhand der Replikationskurve theoretisch bestimmt.

7.4.4 Replikation von *C. b.* in bovinen Alveolarmakrophagen

Für die Bewertung des Replikationsverhaltens der *C. b.*-Stämme in den etablierten *In vitro*-Systemen wurden bovine Alveolarmakrophagen vergleichend untersucht. Da die Generierung der Alveolarmakrophagenkultur aufwendig ist, wurden die Replikation nur von ausgewählten *C. b.*-Stämmen - den Referenzstämmen Nml, Nmll und H - aufgenommen. Bei diesen *C. b.*-Stämmen konnte nur eine geringfügige Veränderung der GE über den gesamten Untersuchungszeitraum festgestellt werden (Abbildung 16). Nml wies im Vergleich zu den anderen Isolaten den stärksten Zuwachs der GE mit einem Anstieg von einer log-Stufe auf. Die Replikationskinetik zeigte hierbei einen biphasischen Verlauf mit einem deutlichen Abfall der Bakterienkonzentration am Tag 7 auf. Dagegen wies die Kinetik von Nmll nur einen minimalen Zuwachs mit einer Verdopplung der GE am 7 d *p. i.* auf, welcher im weiteren Verlauf bis Tag 14 stagnierte. Das Isolat H zeigte im Vergleich zu den beiden Nm-Formen bereits 24 h *p. i.* eine hohe zellassoziierte GE-Zahl, die sich über die Zeit von 14 Tagen kaum veränderte.

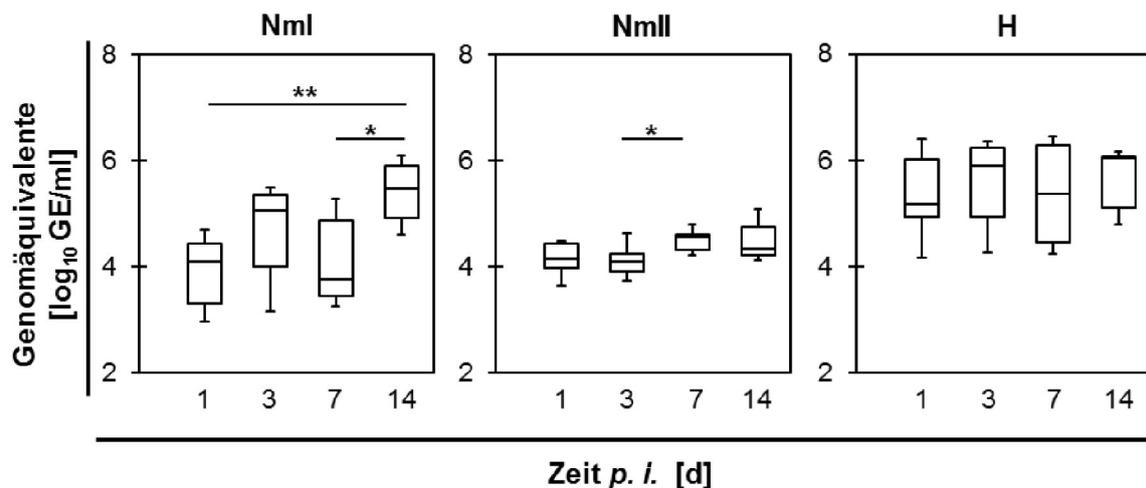


Abbildung 16: Quantifizierung der intrazellulären Lebendkeimzahl nach Inokulation von bovinen Alveolarmakrophagen mit *C. b.* Makrophagen wurden mit verschiedenen *C. b.*-Stämmen (100 MOI, 1 h) infiziert und Genomäquivalente mittels *real-time* PCR bestimmt. Dargestellt sind Boxblots mit Werten aus 4 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 technischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem *t*-Test (**: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$).

7.5 Reaktion der Makrophagen auf eine Infektion mit *C. b.*-Stämmen

Der Replikationszyklus von intrazellulären Erregern wird durch die Reaktion der Wirtszelle entscheidend beeinflusst (Eisenreich et al. 2013, Ghigo et al. 2009). Um die Wechselwirkung mit den Wirtszellen zu studieren, wurden die MDM-Kulturen mit 13 *C. b.*-Stämmen (Tabelle 1) infiziert und die mRNA-Expression verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und Chemokine bestimmt.

7.5.1 *C. b.*-bedingte Immunreaktion in bovinen MDM

In einem Vorversuch wurde die Expression von Zytokinen und Chemokinen innerhalb der ersten 7 Tage nach Infektion mit den LPS-Phase I- bzw. II-Varianten des Stammes Nine mile sowie einer hitzeinaktivierten Suspension von Nml untersucht. Dabei zeigte sich, dass bovine MDM abhängig vom Inokulat und der Zeit bestimmte Zytokine sowie Chemokine exprimierten (Tabelle 15). Der Einfluss des Inokulates auf die Expression war vor allem durch den LPS-Phasentyp bedingt und unabhängig von der Hitzebehandlung. Dies zeigte sich besonders nach einer Inkubation von 3 h, wo sowohl der aktive als auch der hitzeinaktive Nml eine bis zu 92 % stärkere Transkription der Mediatoren als NmII induzierte.

In der frühen Phase der Infektion führte eine Stimulation mit Nml oder einer hitzeinaktivierten Suspension zu einer zur Zellkontrolle signifikant erhöhten Expression von Th1-spezifischen Zytokinen, wie u. a. IL-1 β , IL-12 und TNF- α . Dagegen wurden Th2-spezifische Mediatoren, wie IL-10 und MCP-1 (obwohl signifikant erhöht gegenüber der Zellkontrolle), verhältnismäßig gering transkribiert. Eine gesteigerte Expression konnte bei der induzierten NO-Synthase mit einer 78-fachen ($p = 0,001$) oder 44-fachen ($p = 0,001$) Erhöhung bei Nml bzw. der hitzeinaktivierten Form verzeichnet werden. Mit Ausnahme von IFN- γ erlangten alle Zytokine und Chemokine innerhalb der ersten 3 h *p. i.* ihre höchste Expression und fielen im Verlauf der Infektion signifikant ab. Besonders deutlich wurde dies bei IL-1 β und IL-12, wo es nach einer Inkubationsdauer von 3 h zu einer 755 bis 2.181-fachen Erhöhung der mRNA-Konzentration kam, die bereits 21 h später um mehr als 95 % abfiel. Die Transkription von IFN- γ stieg dagegen bis zu Tag 3 um das 11-fache an. Im Vergleich dazu konnte bei einer Stimulation mit *E. coli* LPS in der Zeitspanne bis 1 d *p. s.* eine gesteigerte Expression der Immunmediatoren festgestellt werden. So kam es zu einer Erhöhung der mRNA-Konzentration von IL-1 β um 65 % und IL-12 um 86 % (Tabelle 11).

Der Stamm NmII induzierte innerhalb der ersten 3 h nur eine leichte Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-12, IFN- γ) mit einem Faktor von 3 bis 6. Die übrigen Zytokine und Chemokine blieben im Vergleich zur Zellkontrolle über den gesamten Untersuchungszeitraum fast unverändert. Lediglich für IFN- γ und MCP-1 konnte 1 d *p. i.* bzw.

3 d *p. i.* ein signifikanter Rückgang der mRNA-Menge um 60 % (IFN- γ) oder 80 % (MCP-1) festgestellt werden.

Um zu überprüfen, ob die Reaktionskinetik in bovinen MDM stammabhängig ist, wurde innerhalb der *lag*-Phase (bis Tag 3 nach der Infektion) für weitere 5 *C. b.*-Stämme (H, S, D, Z3055/92 und Z69/06) die Wirtszellreaktion untersucht. Die in Tabelle 16 dargestellten Ergebnisse zeigten ebenfalls eine Induktion der verschiedenen Zytokine und Chemokine innerhalb der ersten drei Stunden nach der Infektion. Im weiteren zeitlichen Verlauf fiel die mRNA-Menge stark ab. Am 3. Tag reagierten die bovinen MDM nach Infektion mit allen *C. b.*-Stämmen ähnlich wie die Zellkontrolle. Eine erhöhte mRNA Transkription nach 3 h konnte vor allem bei Th1-spezifischen Zytokinen (IL-1 β , IL-12 und TNF- α) nachgewiesen werden. Bei einem Vergleich der Stämme untereinander zeigte sich, dass bovine MDM nach einer Infektion mit dem Isolat Z69/06 abweichend reagierten. So sank die mRNA-Konzentration von Th1-spezifischen Zytokinen zwischen 3 h und 1 d *p. i.* um 50-60 %. Die Expression der IFN- γ - (94 %), RANTES- (52 %) und iNOS-spezifischen mRNA (56 %) nahm hingegen deutlich zu. Die Infektion mit dem Isolat D führte zu einer starken Inhibierung der Zytokin- und Chemokin-Expression 3 d *p. i.*, die im Vergleich zur Zellkontrolle bis zu 80 % reduziert war.

7.5.2 *C. b.*-bedingte Immunreaktion in der frühen Phase der Infektion in bovinen MDM

Anhand der starken Induktion der immunmodulatorischen Mediatoren nach einer Infektionsdauer von 3 h wurde dieser Zeitpunkt zur Erstellung von Expressionsprofilen verschiedener *C. b.*-Stämme gewählt. Die 13 heterogenen *C. b.*-Isolate induzierten in bovinen MDM vorrangig eine von Th1-Zytokinen dominierte Immunantwort mit einer erhöhten Expression von IL-1 β , IL-12 und TNF- α (Tabelle 17). Besonders auffällig war die sehr starke Induktion von IL-1 β und IL-12 durch die Referenzstämme Nml, H und D. Im Vergleich dazu führte die Stimulation mit Isolaten aus aktuellen Ausbrüchen (2010-2011) kaum zu einer messbaren Reaktion der MDM. IFN- γ wurde ebenfalls stammspezifisch induziert. So zeigte der Stamm Cb 30/14 eine signifikante Erhöhung (6-fach) und der Stamm Z3055/91 eine signifikante Reduktion (80%) der IFN- γ Expression im Vergleich zur Zellkontrolle auf. Dagegen induzierten die anderen Stämme keine oder eine schwache Reaktion im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle. Im Vergleich dazu reagierten bovine MDM auf den Kontakt mit *C. b.* mit einer deutlich geringeren Transkription von Th2-spezifischen Zytokinen, wie IL-10 und TGF- β . Vor allem die Referenzstämme Nml, H und D induzierten eine signifikante Erhöhung von IL-10. Dagegen zeigten bovine MDM, welche mit Stämmen von Ausbrüchen zwischen 2010-2011 infiziert wurden, kein signifikant zur Zellkontrolle verändertes IL-10-Profil.

Tabelle 15: C. b.-Stamm Nm induzierte Zytokin- und Chemokin-Expression in bovinen MDM. Bovine MDM wurden mit den C. b.-Stämmen NmI bzw. NmII infiziert oder mit einer hitzeinaktivierten Präparation von NmI (NmI_HI) inkuliert (100 MOI bzw. MOI-Äquivalente). Die relative mRNA-Menge für die Expression von verschiedenen Zytokinen sowie Chemokinen wurde 3 h, 1 d, 3 d und 7 d p. i. mittels *real-time* PCR quantifiziert und auf die Expression des HKG *gapdh* normalisiert. Mit Hilfe eines Randomisierungstests wurden die Δ CT-Werte paarweise mit der Zellkontrolle in 3 unabhängigen Versuchen (SD siehe Tabelle 22) verglichen (signifikante Werte [$p \leq 0,05$] **kursiv** gekennzeichnet).

C. b.-Stamm	Zeit p. i.	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	IFN- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
NmI	3 h	2181	29,5	28,7	1058,1	164,5	1,7	2,6	30,2	22,6	77,8
	1 d	25,1	2,8	2,3	29	4,4	0,6	0,6	2,6	26	5,8
	3 d	10,8	3,2	1,8	3,2	3,6	1,1	10,7	0,8	8,3	5,2
	7 d	3,9	0,9	1,3	1,6	1,5	0,9	2,4	1,4	2,3	2
NmII	3 h	6,2	1,2	1,5	3,7	2,4	0,7	3,2	0,6	0,9	1,4
	1 d	2,6	1,3	0,8	6,6	1	0,6	0,4	0,2	1,5	4,5
	3 d	1,2	1,2	0,8	1,2	0,9	0,7	0,9	0,3	0,7	2,4
	7 d	2,7	1,4	1,1	2,1	1,4	0,8	3,2	0,9	1,8	3,6
NmI_HI	3 h	1077,2	21,9	15,9	754,8	87,2	1,3	1,6	16,8	20,5	44,2
	1 d	42,5	3,3	2,1	43,4	4,7	0,6	0,5	4,9	21,5	6,7
	3 d	3,5	1,7	1	1,9	2,1	1	11	1,1	6,6	2,5
	7 d	3,5	0,8	1	1,5	1,6	0,9	0,5	0,6	1,7	2,1

<ZK =ZK >ZK

Tabelle 16: C. b.-induzierte Zytokin- und Chemokin-Expression in bovinen MDM. Bovine MDM wurden mit verschiedenen C. b.-Stämmen infiziert (100 MOI). Die relative mRNA-Menge für die Expression von verschiedenen Zytokinen sowie Chemokinen wurde 3 h, 1 d und 3 d p. i. mittels *real-time* PCR quantifiziert und auf die Expression des HKG *gapdh* normalisiert. Mit Hilfe eines Randomisierungstests wurden die Δ CT-Werte paarweise mit der Zellkontrolle in 3 unabhängigen Versuchen (SD siehe Tabelle 23) verglichen (signifikante Werte [$p \leq 0,05$] *kursiv* gekennzeichnet).

C. b.-Stamm	Zeit p. i.	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	IFN- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
H	3 h	1960,5	23,5	17,2	1288,6	198,9	2,2	2	20	22	80,6
	1 d	64,2	5,7	1,4	36,5	5,3	0,7	0,3	5,1	23,9	16,3
	3 d	3,9	1,5	0,9	1,2	1,3	0,8	8,0	0,5	3,3	6,2
S	3 h	94,3	3	3,7	44,6	20,2	0,9	2,5	3,5	2,3	3,4
	1 d	3,9	3,1	1,4	4,3	1,3	0,9	2	1,5	5,2	2,6
	3 d	0,2	1,3	1	1	1,5	1,2	12,2	0,8	2,1	0,8
D	3 h	2006,3	22,3	21,1	2117,6	187,6	2,3	1,8	21,8	21,4	68,9
	1 d	39,6	4,2	1,9	17,9	4,4	0,8	0,4	2,3	20,1	9,4
	3 d	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,7	0,1	0,5	0,2
Z3055/92	3 h	52,5	2,6	4,3	14,6	6,4	0,7	0,2	4,7	3	3,2
	1 d	9,7	2,4	3,1	1,9	2,7	1,1	2,6	1,2	6,7	3,3
	3 d	1,1	0,7	1,1	1,2	1	1,2	3,9	1	1,4	0,6
Z69/06	3 h	45,2	2	5,4	19,4	8,3	0,7	0,7	4	3,6	3,4
	1 d	18,3	1,9	2,9	11,7	4,5	1	18,8	0,7	7,4	7,6
	3 d	3,4	1,6	1	1	1,8	1,1	2,5	0,6	2,8	2,6

<ZK =ZK >ZK

Ergebnisse

Die gemessene mRNA-Synthese von Chemokinen, wie IL-8, MCP-1 und RANTES, wies ebenfalls auf eine stammspezifische Reaktion der bovinen MDM hin. Einige Stämme (Nml, H, D) induzierten eine signifikante Erhöhung der Chemokin-Expression. Dagegen lösten Isolate aus aktuellen Ausbruchsgeschehen (u. a. Cb 23/2 oder Cb 98/2) keine oder eine reduzierte Chemokin-Expression aus. Eine erhöhte mRNA-Menge der induzierbaren NO-Synthese um einen Faktor von 69 bis 81 konnte dagegen nur bei den Referenzstämmen Nml, H und D nachgewiesen werden. Diese Expression lag teilweise 50 % über der iNOS-Konzentration nach einer Stimulierung mit *E. coli* LPS. Keine veränderte Expression konnte bei Wiederkäuer-Isolaten aus aktuellen Ausbruchsgeschehen festgestellt werden.

7.5.3 Einfluss von *C. b.* auf die Sezernierung von IL-1 β durch bovine MDM

Das Zytokin IL-1 β wird zunächst als Vorläuferprotein translatiert und vor der Sezernierung aus der Zelle proteolytisch im Zytoplasma in die aktive Form gespalten (Dinarello 1998). Eine direkte Aussage über die Expression von IL-1 β kann somit nicht ausschließlich auf Basis der mRNA-Menge erfolgen. Für die Konzentrationsbestimmung des aktiven Proteins im Überstand der bovinen MDM wurde deshalb ein *in-house*-IL-1 β -ELISA durchgeführt. Wie in Abbildung 17A dargestellt, konnte eine signifikant erhöhte IL-1 β -Konzentration in bovinen MDM ausschließlich nach einer *E. coli* LPS-Stimulation gemessen werden. Die Infektion mit den Referenzstämmen Nml bzw. NmII sowie die Stimulation mit einer hitzeinaktivierten Nml-Suspension führten nach einer Inkubation von 24 h zu keiner gesteigerten Sezernierung des Proteins im Vergleich zur Zellkontrolle. Dies spiegelt nicht die Ergebnisse der mRNA-Expression, wie in Tabelle 15 dargestellt, wider. Die intrazelluläre Konzentration von IL-1 β wurde zusätzlich 24 h *p. i.* mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde ein vollständig gereiftes bovines IL-1 β Protein (rekombinant) verwendet. Wie in Abbildung 17B dargestellt, konnten ebenfalls nur nach einer Stimulation mit *E. coli* LPS die Vorläuferform und weitere proteolytische Abbauformen des Proteins nachgewiesen werden. Die Nm-Varianten induzierten nur eine sehr schwache Bande des IL-1 β -Vorläuferproteins. Bei der unstimulierten Kontrolle konnte kein IL-1 β Protein nachgewiesen werden.

Neben den Nm-Varianten wurden zudem die Überstände von bovinen MDM untersucht, welche mit verschiedenen *C. b.*-Stämmen inokuliert wurden. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zu der nicht infizierten Zellkontrolle (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 17. C. b.-induzierte Zytokin- und Chemokिन-Expression in bovinen MDM. Bovine MDM wurden mit verschiedenen C. b.-Stämmen inokuliert (100 MOI bzw. MOI-Äquivalente). Die relative mRNA-Menge für die Expression von verschiedenen Zytokinen sowie Chemokinen wurde 3 h p. i. mittels *real-time* PCR quantifiziert und auf die Expression des HKG *gapdh* normalisiert. Mit Hilfe eines Randomisierungstests wurden die Δ CT-Werte paarweise mit der Zellkontrolle in 3 unabhängigen Versuchen (SD siehe Tabelle 24) verglichen (signifikante Werte [$p \leq 0,05$] **kursiv** gekennzeichnet).

C. b.-Stamm	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	IFN- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
Nml	2181	29,5	28,7	1058,1	164,5	1,7	2,6	30,2	22,6	77,8
Nmll	6,2	1,2	1,5	3,7	2,4	0,7	3,2	0,6	0,9	1,4
H	1960,5	23,5	17,2	1288,6	198,9	2,2	2	20	22	80,6
S	94,3	3	3,7	44,6	20,2	0,9	2,5	3,5	2,3	3,4
D	2006,3	22,3	21,1	2117,6	187,6	2,3	1,8	21,8	21,4	68,9
Z3055/91	52,5	2,6	4,3	14,6	6,4	0,7	0,2	4,7	3	3,2
Z69/06	45,2	2	5,4	19,4	8,3	0,7	0,7	4	3,6	3,4
Cb 23/2	4,1	1,2	1,1	2,7	1,7	0,7	1,3	0,4	1	1,7
Cb 71/3	4,1	1,6	1,2	2,4	2,6	0,9	2,5	0,5	1,1	1,8
Cb 98/2	13,8	1,9	1,8	4,9	4,4	0,7	2,6	0,5	1,3	2
Cb 19/34	2	1,4	1	1,4	0,9	0,9	1,9	0,7	1,1	1,7
Cb 30/14	2,9	1,2	1	0,9	1,5	0,6	6,1	0,5	0,9	1,4
Z3464/92	3,6	1,3	1,1	2,8	1,3	0,9	1,6	0,6	0,7	1,4
Nml_HI	1077,2	21,9	15,9	754,8	87,2	1,3	1,6	16,8	20,5	44,2
LPS	330,4	18,7	8,7	248	83,6	1	5,3	12,5	28,6	33,7

<ZK =ZK >ZK

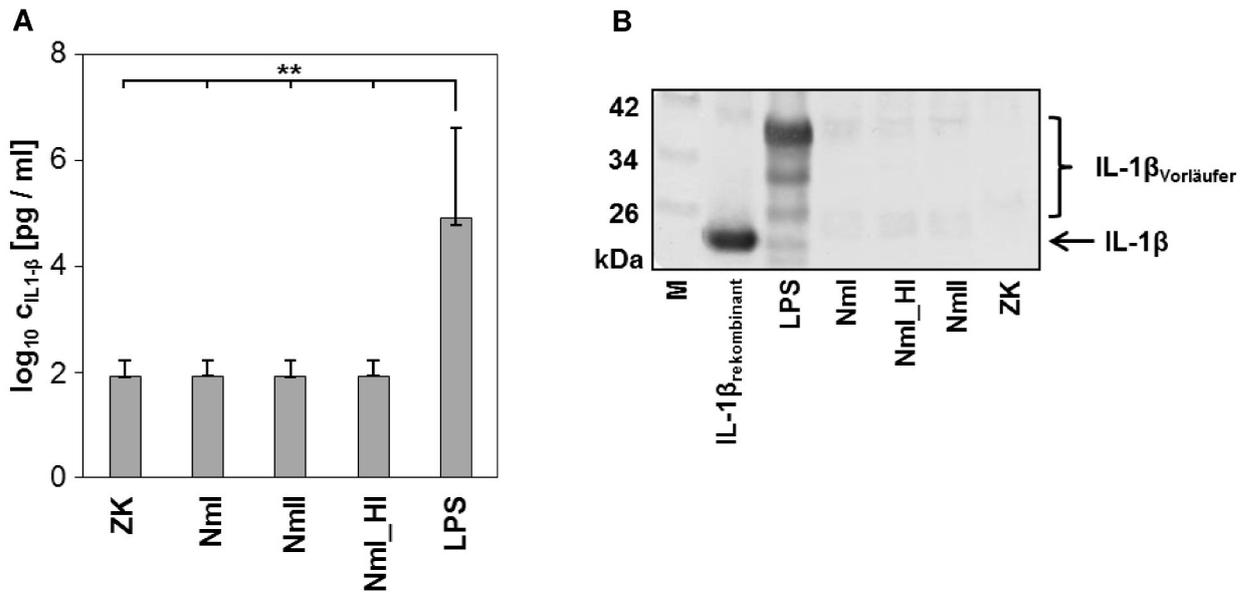


Abbildung 17 : Quantifizierung von sezerniertem IL1-β nach *C. b.*-Infektion von bovinen MDM. Dargestellt in **A** sind die IL-1β Konzentrationen (Median und Min/Max) in Überständen von bovinen MDM (n = 3) nach einer Infektion von 24 h mit Nml oder NmII (100 MOI, 1 h). Als Kontrollen dienten eine Zellkontrolle, sowie eine Stimulation mit einer hitzeinaktivierten Nml-Suspension sowie *E. coli* LPS (6 µg/ml). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (**:p ≤ 0,01). In **B** wurde zusätzlich die IL-1β Konzentration intrazellulär mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen. Dargestellt sind die Vorläuferformen (26-38 kDa) und gereifte Form (17-20 kDa) von IL-1β.

7.5.4 *C. b.*-bedingte Immunreaktion in der frühen Phase der Infektion von humanen MDM

Auf eine Infektion mit *C. b.* reagierten humane MDM innerhalb von 3 h *p. i.* mit einer stammspezifischen Expression von verschiedenen immunmodulatorischen Mediatoren. *C. b.* induzierte in den Zellen eine von Th1-Zytokinen dominierte Immunantwort mit einer erhöhten Expression von IL-1β, IL-12 und TNF-α (Tabelle 19). Besonders IL-12 wurde von allen Stämmen in unterschiedlicher Stärke induziert. Das Phase I-Isolat H löste eine 2.600-fach erhöhte Expression von IL-12 aus. Dieser Wert lag damit deutlich über der mRNA-Menge nach Infektion mit den anderen Stämmen. Neben dem Isolat H führte auch die Inokulation mit den Isolaten D und den Rinder-Isolaten Z69/06 sowie Cb 98/2 zu einer erhöhten Induktion von IL-12. Eine hitzeinaktivierte Nml-Suspension löste im Vergleich zum aktiven Nml eine 3,7-fach erhöhte Transkription von IL-12 aus. Eine vermehrte Induktion von IL-1β und TNF-α war vorrangig bei den Stämmen H, D sowie Z69/06 ersichtlich. Jedoch war die induzierte mRNA-Synthese im Vergleich zu einer *E. coli* LPS-Stimulation um bis zu 600-fach reduziert. IFN-γ wurde ebenfalls stammspezifisch induziert (Tabelle 19). Nach einer Infektion mit dem ovinen Isolat Cb 23/2 kam es zu einer signifikant erhöhten Expression von IFN-γ. Auffällig war zudem, dass eine hitzeinaktivierte Suspension von Nml eine 6,8-fach höhere IFN-γ-Transkription induzierte als der aktive Nml (p = 0,001).

Ergebnisse

Humane MDM reagierten auf die Infektion mit *C. b.* mit einer deutlich geringeren Expression von Th2-spezifischen Zytokinen (IL-10 und TGF- β). Die Stämme Nml, H, D und Z69/06 induzierten eine zur Zellkontrolle signifikant erhöhte Transkription von IL-10-mRNA. Eine Ausnahme stellte Cb 23/2 dar, welcher die IL-10-Induktion um 70 % zur nicht infizierten Kontrolle reduzierte ($p = 0,001$). Alle anderen *C. b.*-Stämme lösten dagegen kaum eine Veränderung im Vergleich zur Zellkontrolle aus. Die Expression von TGF- β blieb nach dem Kontakt mit *C. b.*-Stämmen weitgehend unverändert. Der caprine Stamm Cb 19/34 zeigte als einziges Isolat eine tendenzielle Herabregulation von TGF- β ($p = 0,046$). Die Expression von Chemokinen, wie IL-8, MCP-1 und RANTES, war ebenfalls stammspezifisch verändert. So zeigten humane MDM nach einer Infektion mit H, D und Z69/06 eine deutlich erhöhte Expression von IL-8 auf. RANTES wurde dagegen mit Ausnahme von H und D kaum transkribiert. Differentielle Unterschiede in der Chemokin-Induktion war beim caprinen Stamm Cb 19/34 zu beobachten. So induzierte das Isolat eine deutlich erhöhte Expression von MCP-1 ($p = 0,043$) und inhibierte gleichzeitig die Expression von RANTES ($p = 0,0325$). Die induzierbare NO-Synthase wurde in humanen MDM nach einer Inokulation mit *C. b.* im Vergleich zur Zellkontrolle nicht verändert exprimiert. Die beiden Wiederkäufer-Isolate Cb 98/2 und Cb 19/34 führten zu einer deutlichen Reduktion der iNOS-mRNA um 90-99 %.

7.5.5 Vergleichende Analyse der Wirtsreaktion in bovinen und humanen MDM

Um stammspezifische Expressionsmuster zu charakterisieren, wurde die *C. b.*-induzierte Wirtsreaktion in bovinen und humanen MDM vergleichend untersucht. Wie bereits in Abschnitt 7.4.3 beschrieben, korreliert das bakterielle Wachstum in MDM mit dem MLVA-Genotyp. Aufgrund dieser Ergebnisse und Hinweisen aus der Literatur (Russell-Lodrigue et al. 2009) wurde die Transkription der immunmodulatorischen Mediatoren auf den MLVA-Genotyp des Stammes bezogen und die Werte zwischen den beiden MDM-Kulturen verglichen. Dabei zeigte sich, dass besonders Stämme des MLVA-Typs IV (Nml, H, Z69/06) im Vergleich zur Zellkontrolle eine starke bis sehr starke Transkription von Th1-spezifischen Zytokinen sowohl in bovinen als auch humanen MDM induzierten (Tabelle 18). Dagegen führte eine Infektion mit den Stämmen des MLVA-Typs I (Cb 23/2, Cb 19/34, Cb 30/14, Z3464/92) mit Ausnahme von INF- γ und MCP-1 in humanen MDM zu einer schwachen und Isolate des MLVA-Typs II (S, Z3055/92) zu einer milden Wirtsreaktion in beiden MDM-Kulturen. Der MLVA-Typ III (D, Cb 71/3, Cb 98/2, Z69/06) induzierte im Vergleich zum Typ II eine etwas stärkere Wirtsantwort, die jedoch unter der vom MLVA-Typ IV lag. Es konnte somit eine Korrelation zwischen dem Genotyp des *C. b.*-Stammes und der induzierten Wirtsreaktion der MDM abgeleitet werden, welche unabhängig von der Wirtsspezies der MDM war.

Ergebnisse

Tabelle 18: Vergleich der *C. b.*-induzierten Wirtsreaktion in bovinen und humanen MDM. Die Reaktion der stimulierten MDM 3 h *p. i.* wurde in Bezug zum MLVA-Genotypen gruppiert. Die Einteilung der Expressionsintensität erfolgte zytokin- bzw. chemokinspezifisch (+schwach, ++mild, +++stark, ++++sehr stark)².

	bovin				human				
	MLVA-Gruppe				MLVA-Gruppe				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
IL1-β	+	++	+++	++++	IL-1β	+	++	++	+++
IL-8	+	++	++	++++	IL-8	+	++	+++	+++
IL-10	+	++	++	++++	IL-10	+	++	+++	++++
IL-12	+	++	++	++++	IL-12	+	++	+++	+++
TNF-α	+	++	+++	++++	TNF-α	+	+	++	+++
TGF-β	++	+++	+++	++++	TGF-β	+	++++	+++	++++
IFN-γ	++	+	++	++	IFN-γ	+++	+	+++	+
MCP-1	+	++	++	++++	MCP-1	++	++	++++	+++
RANTES	+	++	+++	++++	RANTES	+	+	++	++
iNOS	+	++	+++	++++					

7.5.6 *C. b.*-bedingte Immunreaktion in bovinen Alveolarmakrophagen

Als Vergleich zu bovinen MDM wurde die *C. b.* induzierte Wirtsreaktion in bovinen Alveolarmakrophagen untersucht. Es zeigte sich eine frühe Aktivierung der Zellen innerhalb der ersten 3 h nach der Infektion (Tabelle 20). Das Expressions-Profil ähnelte dem der bovinen MDM, jedoch mit einer deutlich niedrigeren Intensität der mRNA Transkription. Alveolarmakrophagen exprimierten in Folge der Infektion vor allem Th1-spezifische Zytokine (IL-1β, IL-12, TNF-α). Die stammspezifische Transkription wurde besonders an einer 4-fach geringeren IL-1β-Konzentration bei Nml oder an einer bis zu 70-fach erhöhten IL-12-Konzentration bei Stamm H im Vergleich zu den anderen Isolaten deutlich. Erhebliche Unterschiede gab es auch in der Wirtszellreaktion in Folge einer Stimulation mit einem aktiven und inaktiven Nml. Die Expression Th2-spezifische Zytokine (IL-10, TGF-β) und IFN-γ wurde durch die Infektion mit den *C. b.*-Stämmen nicht verändert. Die Induktion von Chemokinen (IL-8, MCP-1, RANTES) differenzierte nur geringfügig zwischen den Isolaten. So inhibierte der humane Stamm H die MCP-1 mRNA-Synthese um 70 % im Vergleich zur Zellkontrolle. Eine erhöhte Expression von RANTES konnte bei H und dem inaktiven Nml beobachtet werden. Die Transkription von iNOS stieg um das 92-fache nach einer Infektion mit dem Isolat H an. Bei den anderen Stämmen wurde iNOS dagegen nur schwach exprimiert.

² Die Expressionsintensität wurde für jedes Zytokin oder Chemokin separat bestimmt. Die Einteilung von schwach bis sehr stark wurde anhand der Expression einer nicht infizierten Kontrolle als niedrigsten Wert und einer *E. coli* LPS-Stimulation als höchsten Wert abgegrenzt und die Quartile dazwischen entsprechend festgelegt. Alle Werte, welche über der *E. coli* LPS-induzierten Expression lagen, wurden als sehr stark definiert.

Tabelle 19: C. b.-induzierte Zytokin- und Chemokin-Expression in humanen MDM. Humane MDM wurden mit verschiedenen C. b.-Stämmen inokuliert (100 MOI bzw. MOI-Äquivalente). Die relative mRNA-Menge für die Expression von verschiedenen Zytokinen sowie Chemokinen wurde 3 h p. i. mittels *real-time* PCR quantifiziert und auf die Expression des HKG *gapdh* normalisiert. Mit Hilfe eines Randomisierungstests wurden die Δ CT-Werte paarweise mit der Zellkontrolle in 3 unabhängigen Versuchen (SD in Tabelle 25) verglichen (signifikante Werte [$p \leq 0,05$] *kursiv* gekennzeichnet).

C. b.-Stamm	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	IFN- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
Nml	8,1	12	2,5	49,1	8,4	1,4	1,9	11,8	1,5	0,8
Nmll	3,5	1,3	0,6	29,5	0,3	1,1	8,2	2,4	1,6	1,1
H	38	50,6	6,6	2596	52,3	0,9	1,2	4,1	4,5	1,4
S	3,8	9,5	1,2	100,2	5,8	1,2	3,9	3,7	1,5	0,8
D	28	22,7	2,2	432,6	18,8	1,3	0,9	6,5	3,7	0,9
Z3055/91	9,2	7,9	1,1	42,9	4,2	1,4	0,6	4,8	1,7	0,8
Z69/06	25	21,4	2,2	269,9	12,4	1,5	0,7	5,5	2,3	1,3
Cb 23/2	1,6	5,6	0,3	68,6	3,6	0,7	19,7	1,9	1,5	0,7
Cb 71/3	4	7,7	0,9	72,8	6,6	0,7	4,6	6,1	0,8	0,9
Cb 98/2	2,3	5,4	0,5	140,7	6,1	0,6	9,1	16	0,9	0,04
Cb 19/34	2	6,4	1,5	25,2	3,7	0,5	2,7	53,6	0,3	0,1
Cb 30/14	2	3,3	1	53,6	3,8	0,9	4,4	2	1	0,8
Z3464/92	3,5	1,3	0,6	29,5	0,3	1,1	8,2	2,4	1,6	1,1
Nml_HI	7,1	12,4	1,1	184,1	1,3	1,1	12,9	3,2	1,2	1,1
LPS	636,5	385,5	6,4	54946,3	564,2	1,1	18,4	1,8	114,8	1,5

Tabelle 20: C. b.-induzierte Zytokin- und Chemokin-Expression in bovinen Alveolarmakrophagen. Bovine Alveolarmakrophagen wurden mit den C. b.-Stämmen Nml, Nmll und H infiziert bzw. mit einer hitzeinaktivierten Präparation von Nml (NmI_HI) inokuliert (100 MOI bzw. MOI-Äquivalente). Die relative mRNA-Menge für die Expression von verschiedenen Zytokinen sowie Chemokinen wurde 3 h p. i. mittels *real-time* PCR quantifiziert und auf die Expression des HKG *gapdh* normalisiert. Mit Hilfe eines Randomisierungstests wurden die Δ CT-Werte paarweise mit der Zellkontrolle in 3 unabhängigen Versuchen (SD in Tabelle 26) verglichen (signifikante Werte [$p \leq 0,05$] *kursiv* gekennzeichnet).

C. b.-Stamm	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	IFN- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
Nml	4,6	1,4	0,7	6,3	3,0	1,2	1,0	1,2	1,7	3,5
Nmll	18,2	2,4	2,1	6,8	5,3	1,1	2,2	1,6	1,6	3,1
H	16,4	1,7	1,4	485,4	15,3	1,3	1,2	0,3	5,6	92,4
Nml_HI	19,9	2,9	1,1	33,0	6,2	1,3	1,1	1,5	3,0	7,4

<ZK =ZK >ZK

7.6 Einfluss verschiedener *C. b.*-Stämme auf die Expression von Oberflächenmarkern auf Makrophagen

Der Einfluss von *C. b.*-Infektionen auf den Aktivierungsgrad der Makrophagen wurde über die Expression spezifischer Oberflächenmarker (CD40, CD80, CD86, MHCI und MHCII) bestimmt.

7.6.1 Kinetik der Expression von Oberflächenmarkern nach *C. b.*-Infektion von bovinen MDM

In Voruntersuchungen wurde der Grad der Expression der untersuchten Aktivierungsmarker auf bovinen MDM im zeitlichen Verlauf untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit Nml, einer hitzeinaktivierten Nml-Suspension sowie *E. coli* LPS stimuliert und die Konzentration der Oberflächenmarker zu verschiedenen Zeitpunkten (3 h, 6 h, 24 h) durchflusszytometrisch bestimmt. Der Abgleich der gemessenen MFI's erfolgte auf die Zellkontrolle (ZK = 1). Die in Abbildung 18 dargestellten Kinetiken der Expression der Oberflächenmarker zeigten eine marker- und induktorspezifische Hochregulation. Der Aktivierungsmarker CD40 wurde von den verwendeten Stimulanzen nach 6 h induziert und stieg bis Tag 1 weiter an. So konnte ein Zuwachs der CD40-Expression von 32 % bei Nml ($p = 0,008$), 45 % bei Nml_HI und 53 % bei LPS ($p = 0,002$) nachgewiesen werden. CD80 wurde von den Stimulanzen unterschiedlich induziert. So wurde nach einer Inkubationsdauer von 6 h sowohl bei dem aktiven als auch bei dem inaktiven Nml eine Erhöhung der Proteinkonzentration um 14 % bzw. 19 % erzielt, welche über den weiteren Versuchsverlauf konstant blieb. Eine LPS-Stimulierung führte ebenfalls nach einer Inkubation von 6 h zu einem Anstieg der CD80-Expression um 60 % ($p = 0,019$), jedoch fiel diese 24 h *p. s.* signifikant ab ($p = 0,025$). Der Oberflächenmarker CD86 wurde durch die verwendeten Stimulanzen 6 h *p. s.* leicht erhöht exprimiert. Dabei stieg die Proteinkonzentration nach einer Infektion mit einem aktiven ($p = 0,040$) oder inaktiven ($p = 0,013$) Nml um bis zu 20 % und nach einer Stimulation mit LPS um 25 % an. Im weiteren Versuchsablauf sank die CD86-Expression bei den 3 Stimulanzen stetig ab. Die Inokulation mit aktiven und hitzeinaktivierten Bakterien des Stammes Nml führten im Vergleich zur Zellkontrolle zu einer signifikanten Reduktion der CD86-Menge um bis zu 20 %. Die Expression von MHC-Molekülen wurde durch die Stimulation nur geringfügig verändert. So induzierte *E. coli* LPS 24 h *p. s.* einen leichten Anstieg der MHCI- und II-Expression um 18 %. Anhand der Kinetiken und der Arbeitsabläufe im S3-Labor wurden die nachfolgenden Versuche für eine Quantifizierung der Oberflächenmarker nach einer Inkubation von 24 h durchgeführt.

Ergebnisse

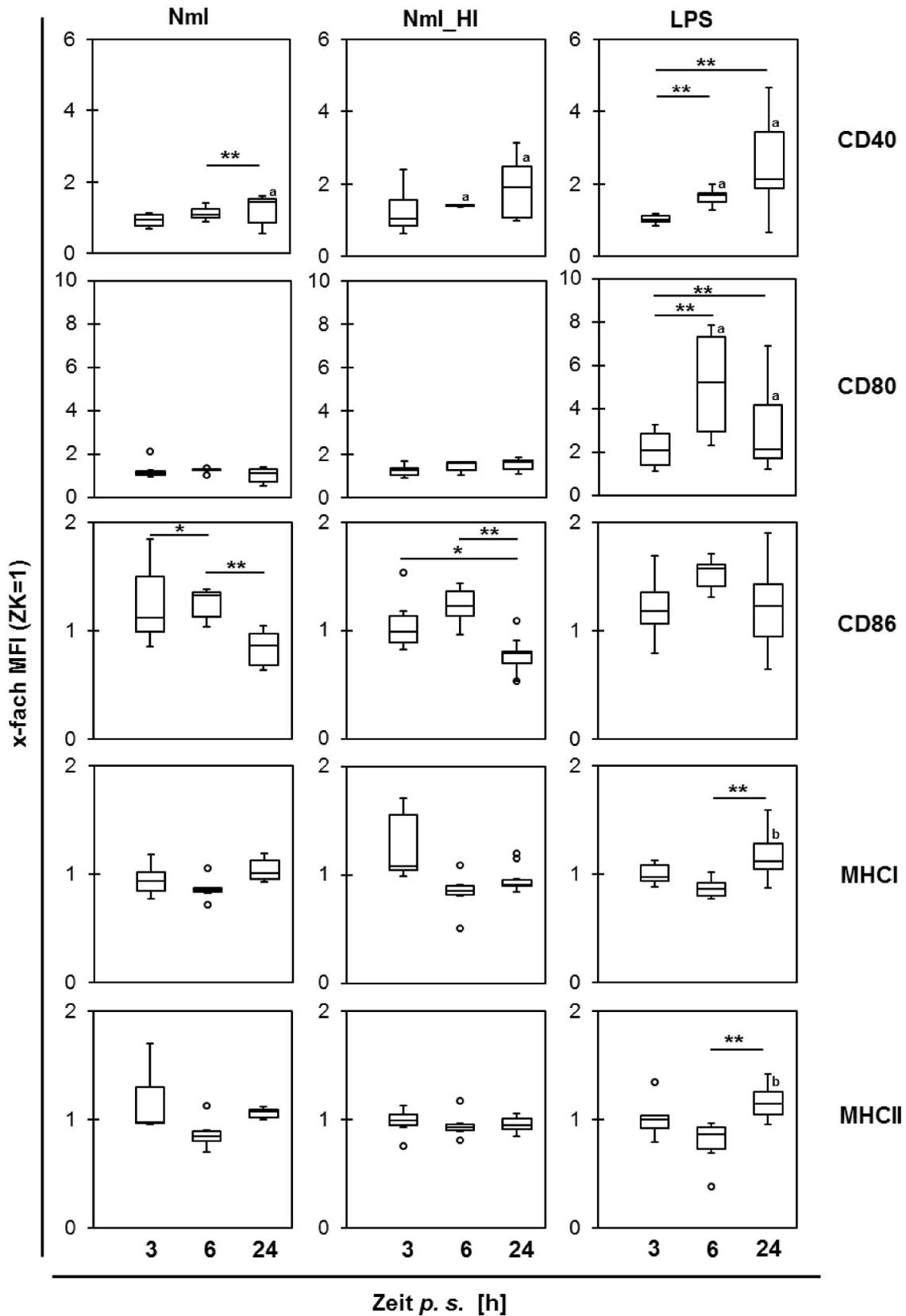


Abbildung 18: Expression von Oberflächenantigenen auf bovinen MDM nach Stimulierung. Bovine MDM wurden mit Nml (100 MOI, 1 h), einer hitzeinaktivierten Nml-Suspension (Nml_HI) oder LPS (6 µg/ml) stimuliert und nach 3 h, 6 h sowie 24 h die Expression von CD40, CD80, CD86 sowie MHC-Molekülen mittels Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt sind Boxplots mit Werten aus 3 bis 6 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 technischen Replikaten abgeglichen auf die Zellkontrolle (ZK = 1). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *t*-Tests zwischen den Stimulanzien (**: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$) sowie zwischen der ZK und dem Stimulanz (b: $p \leq 0,05$; a: $p \leq 0,01$).

7.6.2 Oberflächenmarker-Expression auf bovinen MDM

Der Aktivierungsgrad der bovinen MDM wurden nach Infektion mit verschiedenen *C. b.*-Stämmen untersucht. Wie in Abbildung 19 dargestellt, konnte teilweise eine stammspezifische Reaktion der Zellen auf die Stimulation nachgewiesen werden. Die Stammspezifität wurde besonders bei der Expression von CD40 deutlich. So konnte eine erhebliche Erhöhung der Proteinmenge nach einer Stimulation mit dem humanen Isolat H um 62 % ($p < 0,0001$) und den Kontrollen Nml_HI um 47 % ($p < 0,0001$) sowie LPS um 52 % ($p < 0,0001$) verzeichnet werden. Unterschiede zwischen den beiden LPS-Phasenvarianten von Nm wurden ebenfalls deutlich. So induzierte der Phase II-Stamm im Vergleich zu Nml eine Reduktion um bis zu 50 % des CD40-Proteins. Andere Stämme, wie Z69/06, dagegen führten zu einem signifikanten Anstieg der CD40-Konzentration um 32 % ($p < 0,0001$) auf der Oberfläche von bovinen MDM. Die Reaktion der Zelle auf die Infektion variierte zwischen den Feldisolaten aus aktuellen Ausbruchsgeschehen. So blieb die CD40-Expression bei einigen Isolaten (Cb 23/2, Cb 19/34) unverändert und andere Stämme induzierten dagegen eine leichte Erhöhung (Cb 98/2 um 25 %, $p = 0,003$) oder eine Reduktion (Cb 30/14 um 34 % oder Z3464/92 um 47 %).

Der Aktivierungsmarker CD80 veränderte sich nach Stimulation zumeist nicht. Ausnahmen stellten nur die beiden Stämme H und Z69/06 dar, welche einen Anstieg der Proteinkonzentration um 44 % ($p = 0,001$) bzw. 38 % bewirkten. Eine Reduktion der CD80-Konzentration um 56 % konnte zudem nach einer Infektion mit dem ovinen Isolat Cb 30/14 beobachtet werden.

Das Oberflächenprotein CD86 blieb nach einer Stimulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle meist unverändert oder wurde reduziert exprimiert. Nur das caprine Isolat Cb 71/3 löste eine leichte Erhöhung um 26 % aus. Bei anderen Stämmen, wie Nm-Varianten, H, S, Cb 30/14 sowie Z3464/92, konnte auf der Wirtszelloberfläche eine Reduktion der CD86 Proteinkonzentration von bis zu 25 % detektiert werden.

Die Expression der MHC-Moleküle I und II blieb nach der Stimulation der bovinen MDM im Vergleich zur Zellkontrolle meist unverändert. Eine leichte Erhöhung der MHCI-Konzentration konnte nach einer Infektion mit dem Stamm H oder einer LPS-Stimulation nachgewiesen werden. Insgesamt reagierten bovine MDM auf eine *C. b.*-Infektion mit einer deutlich schwächeren Expression von Oberflächenmarkern als auf eine Stimulation mit *E. coli* LPS.

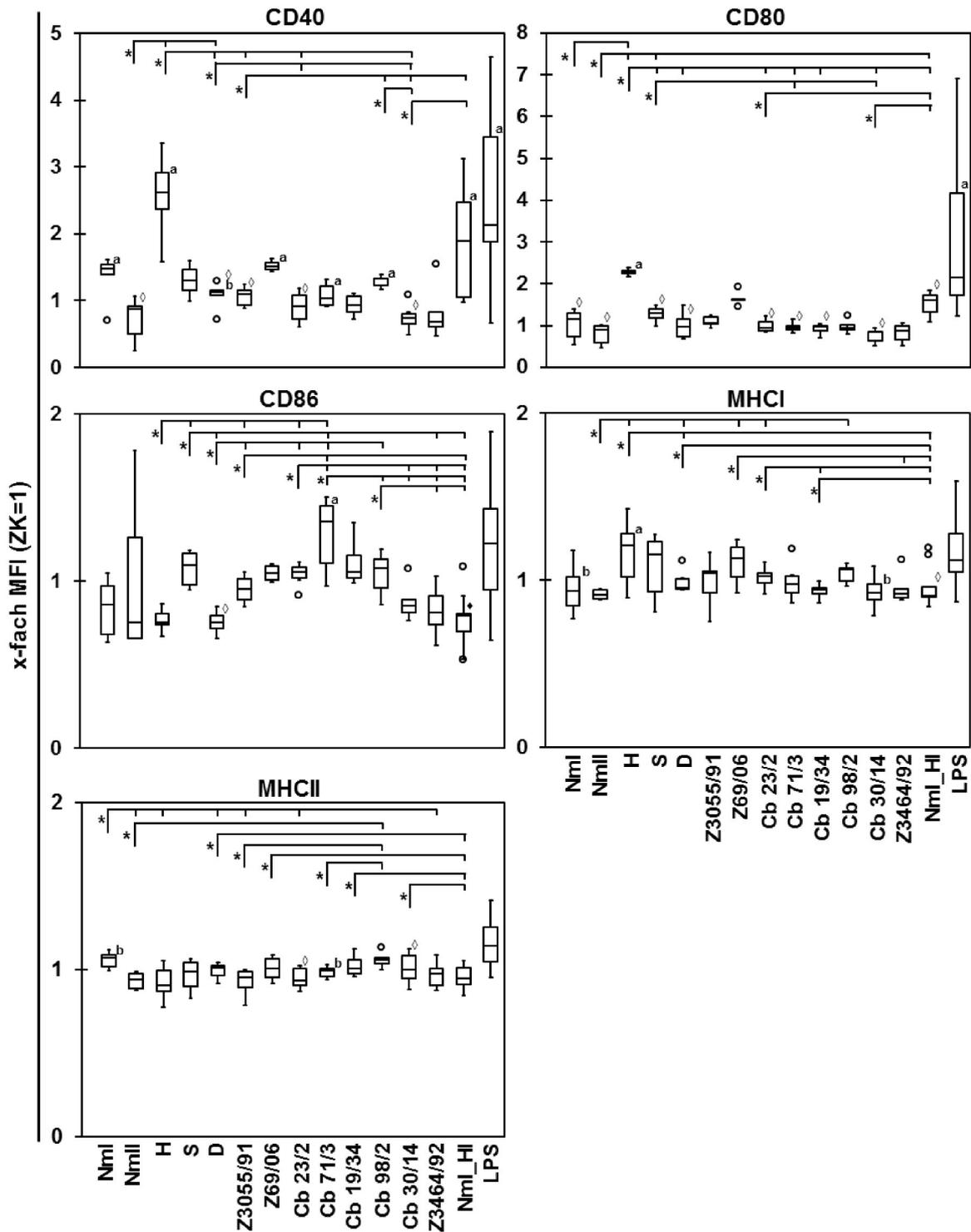


Abbildung 19: Expression von Oberflächenantigenen auf bovinen MDM nach Infektion mit *C. b.* Bovine MDM wurden mit *C. b.*-Stämmen (100 MOI, 1 h), einer hitzeinaktivierten Nml-Suspension (Nml_HI) oder LPS (6 µg/ml) stimuliert und nach 24 h die Marker CD40, CD80, CD86 sowie MHC-Moleküle mittels Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt sind Boxplots aus 3 bis 6 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 technischen Replikaten abgeglichen auf die Zellkontrolle (ZK = 1). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *t*-Tests zwischen den Stimulanzen (*: $p \leq 0,05$; signifikante Unterschiede zu LPS: $\diamond p \leq 0,05$ oder $\blacklozenge p \leq 0,01$) sowie zwischen der ZK und dem Stimulanz (b: $p \leq 0,05$; a: $p \leq 0,01$).

7.6.3 Oberflächenmarker-Expression auf humanen MDM

Humane MDM reagierten nach einer *C. b.*-Stimulation mit einer stammspezifischen Expression der jeweiligen Aktivierungsmarker (Abbildung 20). Das Oberflächenprotein CD40 wurde durch die Stimulation am stärksten beeinflusst. Eine Behandlung mit den beiden Kontrollen - *E. coli* LPS und eine inaktive Suspension von Nml - führten im Vergleich zur Zellkontrolle zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration um 69 % bzw. 32 % ($p < 0,0001$). Die bovinen Isolate Z69/06 sowie Cb 98/2 induzierten einen Anstieg um 33 % ($p = 0,003$) bzw. 21 %. Eine erhöhte CD40-Expression konnte ebenfalls bei den humanen Isolaten S um 34 % ($p = 0,007$) sowie H um 24 % ($p = 0,0001$) festgestellt werden. Eine Infektion mit den anderen *C. b.*-Stämmen führte zu keiner Veränderung im Vergleich zur Zellkontrolle. Die CD80-Expression wurde durch die Stimulation kaum verändert. Eine Ausnahme stellte nur das humane Isolat S sowie die *E. coli* LPS-Kontrolle ($p = 0,048$) dar, die bezüglich zur Zellkontrolle eine leichte Erhöhung um bis zu 25 % induzierten. Das Protein CD86 wurde nach Infektion mit *C. b.* bis auf den Stamm Z3464/92, welcher zu einer Reduktion um 22 % führte, nicht beeinflusst. Bei der Expression von MHCI wurde ebenfalls keine Beeinflussung durch die Infektion mit verschiedenen *C. b.*-Stämmen bzw. Stimulation mit den entsprechenden Kontrollen nachgewiesen. Eine nicht signifikant erhöhte Konzentration des Aktivierungsmarker MHCII konnte nur in Folge einer Stimulation der humanen MDM mit Isolaten von kleinen Wiederkäuern (Z3055/91, Cb 71/3, Cb 19/24 und Z3464/92) festgestellt werden. So stieg die Konzentration des MHCII-Proteins auf bis zu 38 % im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle an.

7.6.4 Oberflächenmarker-Expression auf bovinen Alveolarmakrophagen

Die Infektion von bovinen Alveolarmakrophagen mit *C. b.* führte zu einer stammspezifischen Expression von CD40 auf den Zellen (Abbildung 21). So stieg die Proteinkonzentration in Folge einer Inokulation mit den Stämmen Nml und H um das 1,5-fache im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle an. Eine Infektion mit NmII induzierte dagegen eine Reduktion des CD40-Proteins um 30 % ($p = 0,034$). Die Expression von CD80 wurde durch die Infektion nicht beeinflusst. Lediglich eine NmII-Infektion reduzierte die Proteinkonzentration um bis zu 25 %. Einige *C. b.*-Stämme inhibierte zudem die CD86-Expression. So verringerte sich die Proteinmenge auf den Zellen nach einer Infektion mit NmII um 50 %, mit Stamm H um 21 % ($p = 0,013$) und nach Stimulation mit einem inaktiven Nml um 34 %. Bei einer Infektion mit Nml wurde dagegen keine Veränderung der CD86-Konzentration festgestellt. Die Expression von MHCI und II wurde durch *C. b.* kaum beeinflusst. Eine Ausnahme stellte die Infektion mit NmII dar, wo es zu einer Reduktion des MHCII-Proteins um 34 % im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle kam.

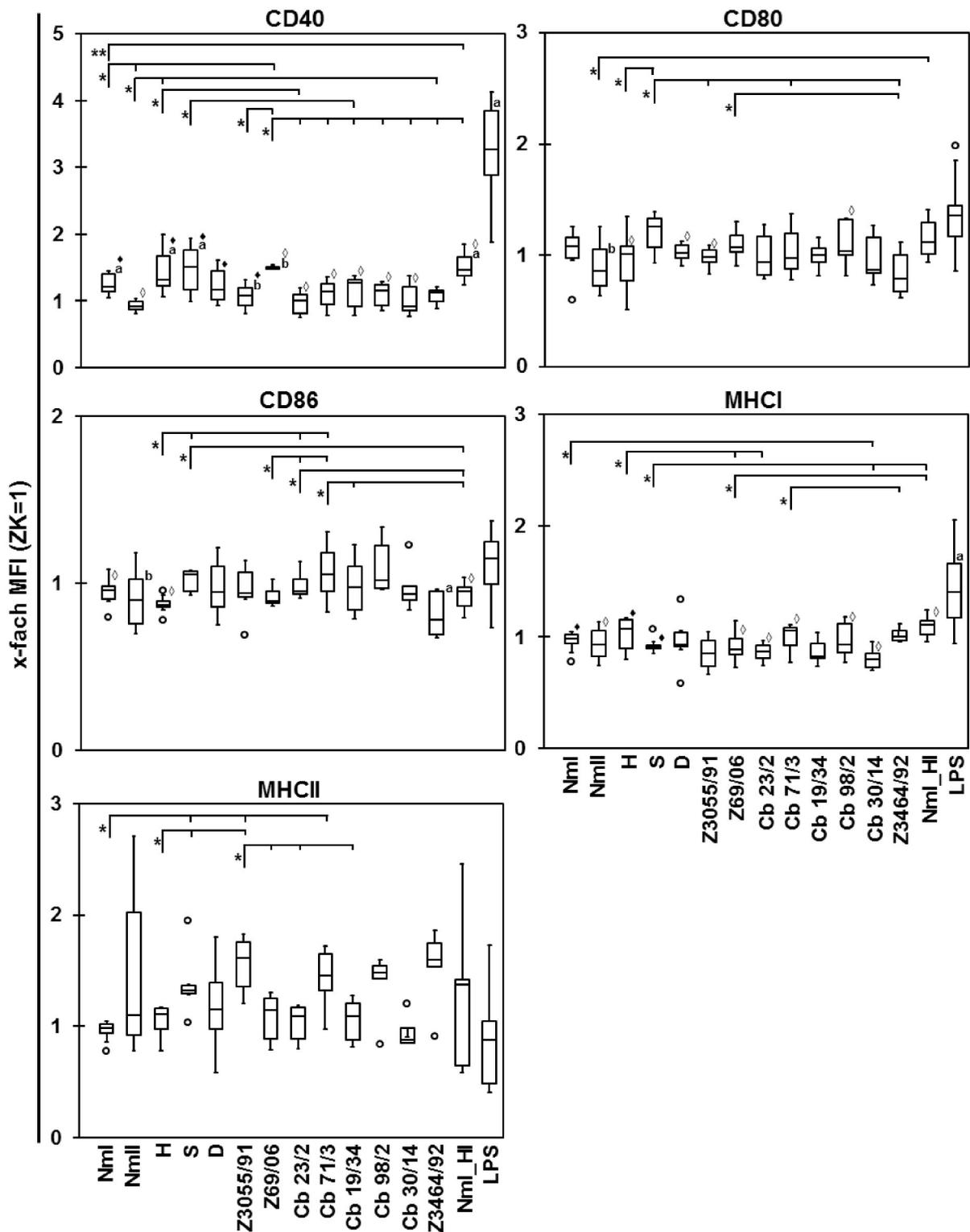


Abbildung 20: Expression von Oberflächenantigenen auf humanen MDM nach Infektion mit *C. b.* Humane MDM wurden mit *C. b.*-Stämmen (100 MOI, 1 h), einer hitzeinaktivierten Nml-Suspension (Nml_HI) oder LPS (6 µg/ml) stimuliert und nach 24 h die Marker von CD40, CD80, CD86 sowie MHC-Moleküle mittels Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt sind Boxplots mit Werten aus 3 bis 6 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 technischen Replikaten abgeglichen auf die Zellkontrolle (ZK = 1). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *t*-Tests zwischen den Stimulanzien (*: $p \leq 0,05$ oder $p \leq 0,01$; signifikante Unterschiede zu LPS: $\diamond p \leq 0,05$ oder $\blacklozenge p \leq 0,01$) sowie zwischen der ZK und dem Stimulanz (b: $p \leq 0,05$; a: $p \leq 0,01$).

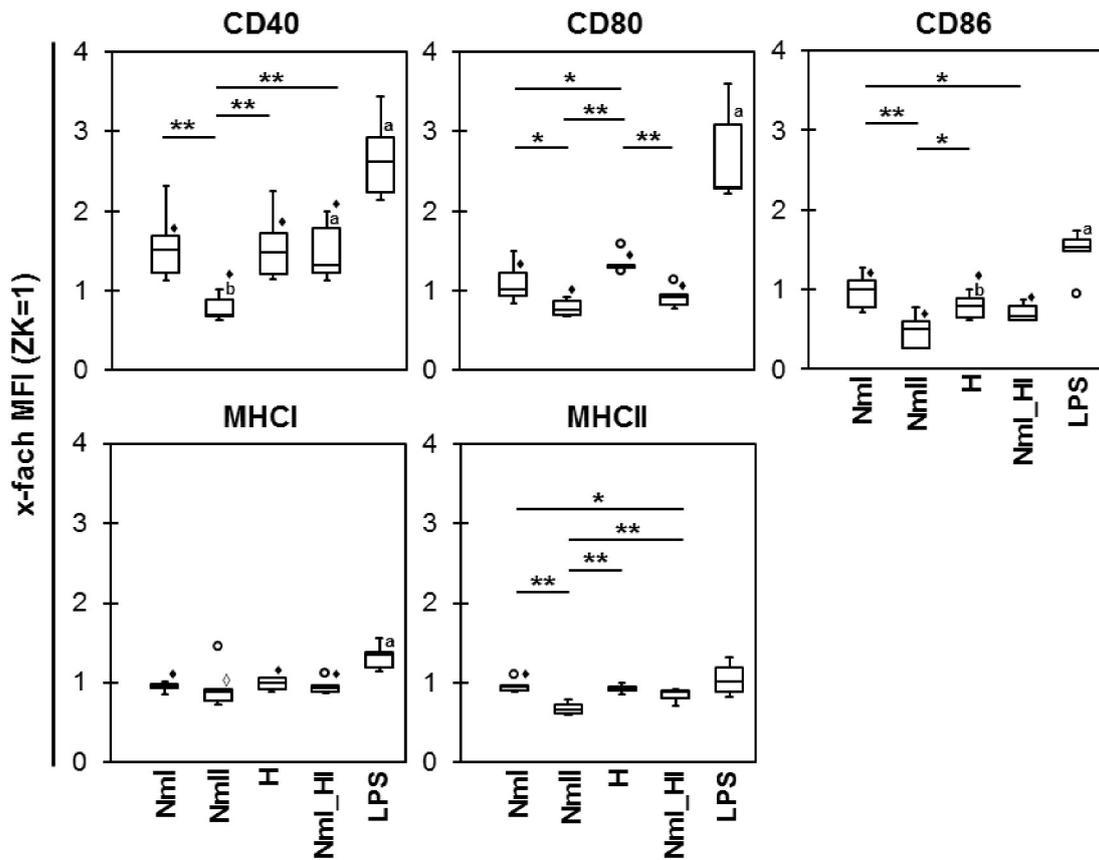


Abbildung 21: Expression von Oberflächenantigenen auf bovinen Alveolarmakrophagen nach Infektion mit *C. b.* Bovine Alveolarmakrophagen wurden mit *C. b.*-Stämmen (100 MOI, 1 h), einer hitzeinaktivierten Nml-Suspension (Nml_HI) oder LPS (6 µg/ml) stimuliert und nach 24 h die Marker von CD40, CD80, CD86 sowie MHC-Moleküle mittels Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt sind Boxplots von Werten aus 3 oder 4 unabhängigen Versuchen mit jeweils 2 technischen Replikaten abgeglichen auf die Zellkontrolle (ZK = 1). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des *t*-Tests zwischen den Stimulanzen (*: $p \leq 0,05$ oder $p \leq 0,01$; signifikante Unterschiede zu LPS: ◊ $p \leq 0,05$ oder ♦ $p \leq 0,01$) sowie zwischen der ZK und dem Stimulanz (b: $p \leq 0,05$; a: $p \leq 0,01$).

8 Diskussion

Coxiellen sind weltweit verbreitet und infizieren als zoonotische Erreger viele wildlebende Tiere, domestizierte Haustiere, Vögel, Arthropoden und den Menschen. Aus den infizierten Wirten konnten verschiedene Stämme von *C. b.* isoliert werden, welche sich durch eine genetische Heterogenität auszeichnen und zum Teil mit spezifischen Krankheitsbildern beim Menschen oder Tier assoziiert wurden. Bis auf Unterschiede innerhalb der LPS-Struktur konnten bislang noch keine *C. b.*-spezifischen Virulenzfaktoren identifiziert werden, welche die unterschiedliche Ausprägung der Krankheitsverläufe erklären würden. Biomarker könnten eine Verbesserung der diagnostischen Verfahren sowie eine Bewertung des Gefährdungspotentials für Nutztierbestände und den Menschen ermöglichen. Vor diesem Hintergrund wurden in der Arbeit 13 *C. b.*-Stämme hinsichtlich ihrer genetischen Merkmale sowie ihres Einflusses auf den Wirt charakterisiert. Die Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktion erfolgte je an einem bovinen und humanen primären Makrophagen-Zellkulturmodell.

8.1 Charakterisierung der primären Makrophagenkulturen

Die Generierung von MDM aus humanem oder bovinem Blut erfolgte über zwei verschiedene Isolationsmethoden: das Teflon-Beutel-Verfahren für bovine MDM (Jungi et al. 1996) und das Plattenadhäsions-Verfahren für humane MDM. Beide Verfahren sind als die Standardmethoden für die jeweilige Spezies beschrieben. Besonders bei bovinen MDM wurde seit der Etablierung des Verfahrens 1996 (Jungi et al. 1996) immer wieder auf diese Methode zurückgegriffen (Janagama et al. 2006, Adler et al. 1996, Menge et al. 2015). Die Generierung von humanen MDM im Teflon-Beutel wurde vereinzelt in Publikationen aufgeführt (van der Meer et al. 1982, Schwager und Jungi 1994), welche sich jedoch durch die erhebliche Varianz in der Ausführung nicht als Standardmethode durchsetzen konnte. Aufgrund dessen wurde die Methode der Plattenadhäsion für die Gewinnung von humanen MDM in dieser Arbeit ausgewählt. Die gewonnenen MDM unterschieden sich neben der Isolation auch durch die Art der Adhäsion und im Differenzierungsgrad. Bei bovinen MDM handelte es sich um ausdifferenzierte Makrophagen, die sich schnell an Oberflächen mit oder ohne einer speziellen Trägersubstanz heften (Salthouse 1984). Humane MDM wurden dagegen als Monozyten ausgesät. Diese Zellen benötigen proteinmodifizierte Biomaterialien, die eine Adhärenz an Oberflächen ermöglichen. Hierzu gehören u. a. Faktoren wie Fibronectin, Fibrin, Serum oder Plasma. Das Zusammenspiel der adhärenzfördernden Proteine, der Zellkulturgefäße sowie die Adhärenzdauer sind ausschlaggebend für die Aktivierung der Monozytendifferenzierung zu Makrophagen (Shen und Horbett 2001). Für die Generierung der humanen MDM wurden deshalb Zellkulturgefäße mit einer erhöhten Adhärenz-Effizienz verwendet. Bovine Alveolar-

Diskussion

makrophagen wurden aus der BALF von Kälbern generiert. Die Anheftung der ausdifferenzierten Makrophagen an die Oberfläche des Trägermaterials war ähnlich wie bei humanen MDM erschwert. Unter Verwendung des IMDM-Beutelm mediums mit einem Anteil von 20 % FKS konnte die Adhärenz der Zellen gesteigert werden. Trotz der unterschiedlichen Präparationsmethoden konnten Zellen generiert werden, die sich aufgrund ihrer Langlebigkeit, Morphologie, sowie Physiologie als Makrophagen definieren ließen.

Humane sowie bovine MDM und Alveolarmakrophagen waren langlebig und konnten über einen Zeitraum von 14 Tagen ohne Mediumwechsel überleben. Ein langer Lebenszyklus von bis zu mehreren Monaten oder Jahren ist ein charakteristisches Merkmal von Makrophagen (van Furth und Cohn 1968, Parihar et al. 2010). Monozyten weisen dagegen eine sehr kurze Lebensspanne auf (van Furth und Cohn 1968) und unterliegen einer spontanen Caspase-3-induzierten Apoptose (Fahy et al. 1999).

Anhand der Morphologie der isolierten Zellen konnten ebenfalls charakteristische Makrophageneigenschaften definiert werden. Neben der Größe (40 μm) wiesen die MDM und Alveolarmakrophagen eine polymorphe Gestalt mit zahlreichen Pseudopodien und Plasmaausstülpungen auf. Der Kern der Makrophagen war zentrisch angeordnet und variierte in der Form. Der Golgi-Apparat und das ER waren auffallend um den Kern lokalisiert. Lysosomen lagen zahlreich im Zytoplasma oder gebunden am Golgi-Apparat vor. Phagozytische Vakuolen konnten im Zytoplasma ebenfalls identifiziert werden. Diese Eigenschaften entsprechen der Morphologie eines typischen Makrophagen. Monozyten sind dagegen deutlich kleiner (12-15 μm) und besitzen einen großen Kern mit stark kondensiertem Chromatin. Die Form der Zellen ist zumeist rund und ausgeprägte Filamentstrukturen werden auf der Oberfläche nicht gebildet. Zudem weisen die Zellen nur ein gering ausgebildetes raues ER, wenige Membran-gebundene Lysosomen sowie keinen dominant ausgeprägten Golgi-Apparat auf (Sutton und Weiss 1966).

Physiologische Eigenschaften, wie die Expression von Zytokinen, Chemokinen oder Oberflächenrezeptoren, variieren zwischen den Entwicklungsstadien der mononukleären phagozytierenden Zellen. So exprimieren Makrophagen beispielsweise nach einer Stimulation mit LPS deutlich höhere Mengen an iNOS und IL-1 β als Monozyten (Jungi et al. 1996, Herzyk et al. 1992). Die generierten bovinen und humanen MDM sowie die bovinen Alveolarmakrophagen wiesen eine sehr hohe Expression von IL-1 β (bis zu 600-fach bei humanen MDM, 900-fach bei bovinen MDM, 1.850-fach bei bovinen Alveolarmakrophagen) nach einer Stimulation mit *E. coli* LPS auf. Dagegen konnte eine Veränderung der iNOS-Konzentration nur bei bovinen Makrophagen festgestellt werden. Hier kam es nach einer *E. coli* LPS-Inkubation von 24 h zu einer 220-fach bzw. 280-fach erhöhten mRNA-Transkription. Humane MDM exprimierten kein iNOS bzw. zeigten nach LPS-Stimulation keine Veränderung der mRNA-Menge im Vergleich zur Zellkontrolle. Die Synthese von iNOS und die Freisetzung von NO in

humanen Makrophagen werden in verschiedenen Publikationen unterschiedlich dargestellt. So sind speziesabhängige Unterschiede in der NO-Produktion bekannt. Murine, bovine und aviäre Makrophagen bilden NO in Folge einer Stimulation. Makrophagen anderer Spezies wie Kaninchen, Ziegen oder Goldhamster weisen dagegen keine iNOS-Aktivität auf und exprimieren zudem nicht den Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH4), welcher für die Stabilität und Funktionalität der iNOS verantwortlich ist (Schneemann und Schoeden 2007, Jungi et al. 1996, Adler et al. 1996, Murray und Wynn 2011b). Einige Arbeitsgruppen konnten eine NO-Aktivität in humanen Makrophagen feststellen. Es gab jedoch keinen Beleg für die Expression von iNOS oder BH4 (Schneemann und Schoeden 2007, Murray und Wynn 2011a). Somit ist zu vermuten, dass die generierten humanen MDM das *inos*-Gen auch in Folge einer Stimulation nicht aktiv transkribieren.

Der Reinheitsgrad der generierten MDM-Kulturen wurde ebenfalls untersucht. Nach Aussaat der Zellen wiesen 81 % der bovinen und 85 % der humanen MDM-Kulturen den CD14-Marker auf. Die CD14-negativen Zellen setzten sich aus T-Zell-Populationen und B-Zellen zusammen. Diese zusätzlichen Zellpopulationen könnten das Modell negativ beeinflussen. Jedoch ist bekannt, dass Lymphozyten einen kurzen Lebenszyklus von 12 h bis maximal 15 Tage besitzen. Von den Lymphozyten weist nur eine kleine Subpopulation von T- und B-Zellen (Gedächtniszellen) eine lange Lebensspanne auf (Coassin und Kline 1957, Sprent 1993). Es ist zu vermuten, dass sich die CD14-negativen Zellen im MDM-Modell hauptsächlich aus naiven B- oder T-Zellen zusammensetzten. Zudem wurden vor jeder Infektion die MDM-Kulturen mehrfach gewaschen, um nicht adhärenente Lymphozyten zu entfernen. Somit konnte der Einfluss anderer Zellpopulationen minimiert werden.

Funktionell sind Makrophagen durch eine ausgeprägte Plastizität gekennzeichnet. Diese befähigt sie, anhand von externen Stimuli ihren Phänotyp sowie ihre Physiologie zu ändern und sich somit an aktuelle Gegebenheiten anzupassen. Bei murinen Makrophagen werden klassisch zwei Populationen (M1- und M2-Makrophagen) definiert, die sich in ihrer Art der Aktivierung, ihrer Polarisierung sowie Physiologie unterscheiden (Mosser und Edwards 2008, Murray und Wynn 2011b). Mit Hilfe einer LPS-Stimulation konnten die generierten bovinen und humanen MDM sowie die bovinen Alveolarmakrophagen zu M1-Makrophagen differenziert werden, was sich aus dem Expressionsprofil von Zytokinen, Chemokinen sowie oberflächenassoziierten Ko-Stimulationsfaktoren ableiten ließ. So exprimierten die Kulturen nach Stimulation vermehrt typische M1-Zytokine sowie Chemokine (Mosser und Edwards 2008, Engstrom et al. 2014), wie IL-1 β , IL-12, TNF- α und RANTES. Bovine MDM und Alveolarmakrophagen bildeten zusätzlich iNOS. Die Sezernierung von NO ist ein wichtiges Merkmal für die klassisch aktivierten M1-Makrophagen. Durch eine *E. coli* LPS-Stimulation wurde die Expression von CD40 und CD80 auf bovinen sowie humanen MDM um das 2 bis 3-fache erhöht. Die Ko-Stimulationsmarker CD40, CD80 und CD86 gehören zu den typischen M1-

Markern und werden durch eine LPS-Stimulation vermehrt auf der Oberfläche exprimiert (Vogel et al. 2013, Qin et al. 2005).

Durch die Expression von verschiedenen immunologischen Markern nach LPS-Stimulation konnte die Stimulierbarkeit und die Funktionalität der Makrophagenkulturen bestätigt werden. Anhand der geringen Varianzen zwischen den einzelnen Präparationen eignen sich MDM als Modell zur Beurteilung der Virulenz von *C. b.* in verschiedenen Wirten.

8.2 Charakterisierung der *C. b.*-Stämme

Die verwendeten 13 *C. b.*-Stämme wurden aufgrund größtmöglicher Unterschiede ausgewählt und umfassten sowohl laboradaptierte Referenzstämme als auch Isolate aus aktuellen Ausbruchsgeschehen. Um einen Zusammenhang zwischen den Erregereigenschaften und der Wirt-Pathogen-Interaktion in Makrophagen zu finden, wurden die Stämme genotypisch und morphologisch untersucht. Die genotypische Charakterisierung ist eine effiziente Methode für die epidemiologische Gruppierung der Stämme. So können über dieses Verfahren Rückschlüsse auf die ökologische Nische, die Verbreitung und indirekt auf die Infektiosität und Virulenz der Isolate gezogen werden. Bei der MLVA-Analyse wurden 7 VNTR's untersucht und die Genotypen anschließend in vier genomische Gruppen (I bis IV) eingeordnet. Von den 13 Stämmen wurden vier Isolate (Cb 23/2, Cb 30/14, Cb 19/34, Z3464/92) in die genetische Gruppe I eingeordnet. Diese verfügen über ein QpH1-Plasmid sowie das *adaA*-Gen. Das klinische Bild war nur bei dem Isolat Z3464/92 als Abort bekannt. Die 4 Isolate der Gruppe I wurden von kleinen Wiederkäuern (Schaf, Ziege) in Deutschland isoliert und wiesen untereinander einen hohen Ähnlichkeitsgrad auf (Abbildung 4).

Trotz hoher Diversität wurden die beiden Isolate S und Z3055/91 in die genetische Gruppe II eingegliedert. Das humane Isolat S besitzt unter den 13 untersuchten Stämmen als einziges kein Plasmid und kein *adaA*-Gen, sondern eine chromosomal integrierte Plasmidsequenz mit einer Homologie zum QpH1-Plasmid mit 17 ORF's (6 ORF homolog zum QpH1-Plasmid) (Willems et al. 1997). Das *adaA*-Gen korreliert mit dem Plasmidtyp und wird nur bei Isolaten mit einem QpH1-Plasmid gefunden (Frangoulidis et al. 2013). Darüber hinaus wurde es als Biomarker für die Vorhersage des akuten Krankheitsverlaufs von *C. b.* in Betracht gezogen. Jedoch konnte diese Theorie in Studien mit einer Vielzahl an humanen und Wiederkäuer-Isolaten mit bekanntem Krankheitsbild nicht signifikant bestätigt werden (Zhang et al. 2005). Der *adaA*-lose Stamm S induzierte Symptome eines chronischen Q-Fiebers (Hepatitis), was mit den genetischen Eigenschaften korrelierte. Dagegen gehört das ovine Isolat Z3055/91 zu den wenigen Stämmen in der Gruppe II, die über ein QpH1-Plasmid und das *adaA*-Gen verfügen. Das QpH1-Plasmid gilt als das ursprüngliche Plasmid der Coxiellen, welches sich durch den evolutionären Druck im Laufe der Zeit genetisch zu den anderen Plasmidtypen differenziert hat (Beare et al. 2006). Deshalb ist davon auszugehen, dass es sich bei dem

Diskussion

Isolat Z3055/91 um eine Übergangsform handelt. Ein klinisches Bild ist zu diesem Stamm nicht bekannt, jedoch besitzt er einen hohen Verwandtschaftsgrad zum Stamm Z66/96 (QpH1⁺, *adaA*⁺), welcher aus einem Abort isoliert wurde.

Die genetische Gruppe III umfasst vier Isolate (D, Z69/06, Cb 71/3, Cb 98/2), die über ein QpH1-Plasmid und *adaA* verfügen. Charakteristisch für diese Gruppe ist ein erhöhter Tropismus zum Rind (Jiménez 2012). Zwei der ausgewählten Stämme (Z69/06, Cb 98/2) wurden von Rindern isoliert. Die MLVA-Typisierung für Z69/06 ergab allerdings, dass es sich hierbei um kein reines Isolat sondern um ein Gemisch aus zwei *C. b.*-Stämmen der MLVA-Gruppe III und IV handelt. Ob die Stämme beide aus der Milch isoliert wurden oder eine Kontamination vorliegt, konnte rückwirkend nicht beurteilt werden. Die anderen beiden Isolate der Gruppe III – Cb 71/3 und D - wiesen keinen hohen Verwandtschaftsgrad zu den bovinen Isolaten auf und grenzten sich deutlich von ihnen ab. Der Stamm D wird in der Literatur als das ursprüngliche Isolat der Coxiellen beschrieben und verfügt über ein QpDG-Plasmid, welches dem QpH1-Plasmid sehr ähnlich ist (Frangoulidis et al. 2013, Jager et al. 2002). Der hier in der Arbeit verwendete Stamm D wies dagegen ein QpH1-Plasmid auf. Der Stamm D (Dugway) wurde in den 50er Jahren am Militärstützpunkt Dugway in den USA isoliert. Es ist bekannt, dass fünf verschiedene Varianten des Stammes existieren, welche sich in ihren genetischen Eigenschaften unterscheiden können (Stoenner und Lackman 1960).

Zur genetischen Gruppe IV gehören neben Nm auch das humane Isolat H sowie der zweite MLVA-Typ von Z69/06. Alle zugeordneten Stämme verfügten über ein QpH1-Plasmid und das *adaA*-Gen. Anhand des Restriktionsmusters wird die Gruppe mit akuten Krankheitsverläufen assoziiert. Die Infektion mit Stamm H ging mit den Symptomen einer Pneumonie einher. Bei den restlichen Stämmen ist kein klinisches Bild bekannt. Die Gruppe IV enthält zudem viele Isolate aus Zecken, die im Infektionszyklus der Coxiellen eine Vektorfunktion einnehmen. Zu den Stämmen gehört u. a. der im Laborbetrieb häufig verwendete Referenzstamm Nm. In den Clustern der Gruppe IV sind mehrere Zecken-Isolate neben Isolaten aus anderen Wirten mit einem hohen genetischen Verwandtschaftsgrad lokalisiert. Dies könnte auf eine vektorbasierende Verbreitung hindeuten. Auch in den anderen genetischen Gruppen zeigt sich innerhalb der einzelnen Cluster mit einem hohen genetischen Ähnlichkeitsgrad eine Vielzahl an Isolaten, die sich im Ursprung des Wirtes oder der geographischen Lage unterscheiden. Bei diesem „Wanderverhalten“ der Coxiellen können beispielsweise die Verbreitung durch Vektoren, Viehverkäufe oder Zucht eine Rolle spielen (Cardinale et al. 2014). Die Diversität der Coxiellen wird zudem durch die einzigartige LPS-Struktur definiert. Es werden drei morphologische Zustände unterschieden, einer virulenten Phase I, einer intermediären Phase und einer avirulenten Phase II. Dem Phasenwechsel liegen Mutationen zugrunde, die zu einer progressiven Verkürzung der LPS-Struktur führt (Vodkin und Williams 1986, Hoover et al. 2002). Die in der Arbeit verwendeten *C. b.*-Stämme wiesen hauptsäch-

lich Phasengemische auf. Nur zwei Isolate konnten einem reinen Phasentyp (H als Phase I und NmII als Phase II) zugeordnet werden. Phase I-Partikel stellen den Wildtypen dar, der in der Natur weit verbreitet und durch eine erhöhte Virulenz geprägt ist. Das Auftreten von intermediären Phasen bzw. Phase II-Partikeln erfolgt durch eine Laboradaption in Folge von mehrfachem Passagieren in Zellkulturen (Hotta et al. 2002). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Entwicklung eines Phase II LPS-Typs und der Zellkulturadaption konnte bei den verwendeten Isolaten nicht festgestellt werden. So enthielten besonders Isolate aus aktuellen Ausbruchsgeschehen (Cb 23/2, Cb 71/3, Cb 19/34) einen höheren Anteil an Phase II-Partikeln als Isolate die bereits mehrere Jahre an die Zellkultur adaptiert wurden.

Der LPS-Struktur wird das Potential zum Biomarker für die Virulenz sowie die Antigenität der Bakterien zugeschrieben (Hackstadt 1986, Hackstadt et al. 1985). So sollen Phase I-Partikel eine höhere Virulenz aufweisen als Phase II-Partikel. Die Virulenz eines *C. b.*-Stammes ist jedoch nicht allein vom Phasentyp abhängig, sondern wird auch von anderen noch unbekannt Faktoren bestimmt (Islam et al. 2013). Die hier verwendeten Stämme waren größtenteils Phasengemische mit einem höheren Anteil an Phase II-LPS. Somit ist eine genaue Differenzierung der Virulenz am Phasentyp nur bedingt möglich. Daneben beeinflussen auch die Morphologie bzw. der Phänotyp der Bakterien die Virulenz für den Menschen (Maurin und Raoult 1999). Im Negativ-Kontrast-Verfahren wiesen die Inokula aller *C. b.*-Stämme eine einheitliche stäbchenförmige Morphologie auf und variierten nur geringförmig in der Größe. Abweichend war lediglich Stamm H, welcher sich durch seine gestreckte Form deutlich in der Größe von den anderen Stämmen unterschied. Die Inokula der einzelnen Stämme enthielten sowohl SCV als auch LCV. Diese Zusammensetzung beeinflusste die Infizierbarkeit der Makrophagenkulturen nicht, da bei Coxiellen beide Phänotypen infektiös sind (Wiebe et al. 1972). In diesem Merkmal unterscheiden sich Coxiellen von dem sehr ähnlichen Entwicklungszyklus der Chlamydien, wo nur eine Form, die Elementarkörperchen, infektiös ist.

Die gleichartige Morphologie der *C. b.*-Stämme gewährten verhältnismäßig einheitliche Bedingungen für die Infektion von Makrophagen und förderten somit die Vergleichbarkeit der Stämme untereinander.

8.3 Infizierbarkeit der bovinen MDM mit *C. b.*

Die Invasivität sowie die Replikationsfähigkeit der Coxiellen konnte in primären Makrophagen der Maus (Brennan et al. 2004) und des Menschen (Shannon und Heinzen 2008) bestätigt werden. Um die Infizierbarkeit des bovinen MDM-Modells zu prüfen, wurden die Zellen unter verschiedenen Bedingungen (Variation in der Infektionsdosis und Inokulationszeit) infiziert. Dabei zeigte sich, dass die Infektionsdosis einen geringeren Einfluss auf die Infektionsrate der Zellen ausübte als die Inokulationsdauer. Diese Limitierung der Invasion wurde bei humanen Monozyten bereits beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass bei einer Infekti-

Diskussion

onsdosis von 100 MOI nach einer Inokulationsdauer von einer Stunde nur 10 % der Coxiellen an den Zellen adhärten und bei einer Dauer von 2 bis 4 h die Rate auf 25 % anstieg. Die Zahl der phagozytierten Bakterien nahm jedoch im Vergleich zu den zellassoziierten Bakterien über die Zeit nicht deutlich zu und blieb bei 2-3 % konstant (Dellacasagrande et al. 2000). Bekannt ist, dass die Invasion gewöhnlich über eine rezeptorassoziierte Phagozytose erfolgt (Meconi et al. 2001). Die Rezeptoren für die Internalisierung der Bakterien sind abhängig von der LPS-Phase. Für die Aufnahme benötigen Phase I-Partikel nur das Integrin $\alpha_v\beta_3$ und Phase II-Partikel zusätzlich den CR3-Rezeptor (Capo et al. 1999b). Beide Rezeptoren wurden auf bovinen MDM und Alveolarmakrophagen exprimiert (Daten nicht gezeigt). Lichtmikroskopisch konnten zudem in beiden bovinen Makrophagenkulturen die PV's nach Infektion detektiert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen histologischer Untersuchungen *C. b.*-infizierter Wiederkäuer, wo in den Makrophagen der Lunge und Plazenta erhöhte *C. b.*-Antigenkonzentrationen nachgewiesen wurden (van Moll et al. 1993, Emikpe et al. 2013).

Neben der Invasivität wurde die Replikationsfähigkeit des Stammes Nml in bovinen MDM über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Der Vermehrungszyklus wird bei den Coxiellen aufgrund der Metamorphose - dem Wechsel zwischen SCV und LCV - als biphasisch bezeichnet. An die Aufnahme von Nml in bovinen MDM schloss sich eine 3 Tage andauernde *lag*-Phase an, die mit der Umwandlung der SCV in LCV verknüpft sein könnte. Diese *lag*-Phase wurde bei humanen MDM (Howe et al. 2010), murinen Makrophagen (Brennan et al. 2004) und bei Vero-Zellen (Coleman et al. 2004) ebenfalls beobachtet. Innerhalb dieser Zeit kommt es zu Veränderungen in der Morphologie und Expression von spezifischen Genen, die die charakteristischen Eigenschaften der LCV in der Stoffwechselaktivität sowie der Reproduktion unterstützen (Minnick und Raghavan 2012). Der *lag*-Phase schließt sich in den bovinen MDM eine exponentielle Wachstumsphase über 7 Tage mit einem Anstieg der Keimzahl von etwa 2 log-Stufen an. Ähnliche Anstiege konnten auch bei humanen Makrophagen mit einem Zuwachs von 1,7 bis 2,4 log (Howe et al. 2010) beobachtet werden. Am Ende der exponentiellen Phase im Übergang zur stationären Phase erfolgt wiederum die Umwandlung der LCV zu SCV. Mit der Morphogenese sind eine Inhibierung der Expression von LCV-Proteinen sowie eine verstärkte Expression von SCV-Proteinen, die für die hohe Umweltresistenz unterstützend wirken, verbunden (Minnick und Raghavan 2012). Der Beginn der stationären Phase von Nml in bovinen MDM konnte jedoch innerhalb des Untersuchungszeitraums nicht erreicht werden. Die ermittelte Verdopplungszeit von Nml in bovinen MDM betrug 25,7 h. Im Vergleich dazu replizierte Nml in humanen MDM mit einer Verdopplungszeit von 11-13 h deutlich effizienter (Howe et al. 2010). In murinen Makrophagen schwankte die Verdopplungszeit von 19 h bei primären Zellen und bis zu 26 h bei permanenten Zelllinien (Brennan et al. 2004). In Epithelzellen replizierte Nml mit einer Verdopplungs-

zeit von 12 h am schnellsten (Coleman et al. 2004). Anhand des Vergleichs der Verdopplungszeiten kann ein wirt- und organspezifischer Trend in der Replikation der Coxiellen abgeleitet werden (Minnick und Raghavan 2012). Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass *C. b. in vitro* bovine Makrophagen invadiert und eine aktive Replikation in diesen Zellen vollzieht. Das bovine MDM-Modell eignet sich somit zur Beurteilung der Replikation von *C. b.*

8.4 Replikationskinetik von verschiedenen *C. b.*-Stämmen in MDM

Bei der Quantifizierung der Replikation von 13 heterogenen *C. b.*-Stämmen in bovinen und humanen MDM zeigten sich stamm- und speziesspezifische Unterschiede im Replikationsverhalten. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in einigen *In vivo*-Studien in Mäusen und Meerschweinchen gemacht (Hackstadt 1990, Kocianova et al. 2001, Russell-Lodrigue et al. 2009). In diesen Untersuchungen korrelierte der RFLP-Genotyp mit der Virulenz der Stämme. So induzierten Isolate des Genotyps IV (*Nml*, *African* und *Ohio*) eine akute Infektion und die des Genotyps V (G und S) eine moderate Form des Krankheitsbildes in Meerschweinchen. Stämme des Genotyps IV (*Priscilla* und P) und VI (*D*) führten zu keiner akuten Infektion. Die zu geringe Stammanzahl ermöglichte jedoch keinen eindeutigen Rückschluss auf die Relevanz der genetischen Diversität auf die Virulenz der Bakterien (Hackstadt 1990, Kocianova et al. 2001, Russell-Lodrigue et al. 2009). Um potentielle Biomarker für die Beurteilung der Replikation von *C. b.* in bovinen und humanen MDM zu finden, wurden die Wachstumsunterschiede der verschiedenen Stämme hinsichtlich ihrer genetischen Merkmale (MLVA-Typ, Plasmidtyp, *adaA*) untersucht. Bei bovinen MDM zeigte sich (Abbildung 14), dass besonders die Stämme der MLVA-Gruppen II (S, Z3055/91) und IV (Nm, H) effizient replizierten. Eine Ausnahme in der Gruppe II war Stamm Z3055/91, der durch den Besitz des QpH1-Plasmids und des *adaA*-Gens eine Übergangsform zum Genotyp III darstellen könnte. Im Meerschweinchenmodell induzierten Stämme beider Genotypen ebenfalls eine akute bis mäßige Infektion (Russell-Lodrigue et al. 2009). Isolate mit einem MLVA-Typ I (Cb 23/2, Cb 19/34, Cb 30/14, Z3464/92) und III (D, Cb 71/3, Cb 98/2) wiesen in bovinen MDM eine deutlich reduzierte Replikation im Vergleich zu Gruppe IV und Stamm S auf. Der Stamm Z69/06 umfasste zwei verschiedene Genotypen (MLVA III und IV) und fügte sich zwischen diesen beiden Gruppen mit einem deutlich erhöhten Replikationsfaktor im Vergleich zur Gruppe III bzw. deutlich niedrigeren als Gruppe IV ein. Meerschweinchen, die mit Stämmen der beiden Genotypen inokuliert wurden, entwickelten keine Symptome einer akuten Infektion (Russell-Lodrigue et al. 2009). Bei humanen MDM wurde ebenfalls eine Korrelation des MLVA-Typs mit der Replikation ersichtlich (Abbildung 14). Ähnlich den bovinen MDM replizierten hier die Isolate der MLVA-Gruppe IV am effektivsten und die der Gruppe III am geringsten. Der Stamm Z69/06 zeigte anhand des Zuwachses eine deutlich stärkere Affinität zur Gruppe IV, was eine schwächere oder keine Replikation der Typ III-Kontaminante bedeu-

ten könnte. Die Isolate des MLVA-Typs I wiesen eine Teilung in zwei Gruppen auf, mit einer stark (Cb 30/14, Z3464/92) und einer schwach (Cb 19/24, Cb 23/2) replizierenden Population. Bei bovinen MDM konnte dieser Unterschied zwischen den Stämmen ebenfalls ansatzweise beobachtet werden. Die Stämme der MLVA-Gruppe II und III replizierten in humanen MDM mit einer ähnlichen Effizienz. Somit scheint die genotypabhängige Replikationsrate der Stämme in bovinen und humanen MDM mit dem Schweregrad des Infektionsverlaufes im Labortier positiv korreliert zu sein. Unter Vermeidung von Tierversuchen könnte die vom Nagermodell abgeleitete Theorie (Russell-Lodrigue et al. 2009) unter Nutzung des in dieser Studie entwickelten MDM-Modells weiter entwickelt werden.

Aber auch andere Faktoren müssen das bakterielle Wachstum in MDM beeinflusst haben. Gründe für diese Annahme sind vor allem in der Varianz der Replikationseffizienz zwischen humanen und bovinen MDM zu sehen. Einflussfaktoren könnten u. a. der LPS-Phasentyp sein, welcher die Virulenz von *C. b.* beeinflusst (Abbildung 14). Bekannt ist, dass Phase II-Partikel dem wirtseigenen Immunsystem stärker ausgesetzt sind als Phase I-Partikel (Slaba et al. 2003) und dadurch schneller eliminiert werden. Somit können sich virulente Phase I-Partikel in immunkompetenten Tieren besser replizieren als avirulente Phase II-Partikel (Andoh et al. 2005). Sowohl bei bovinen als auch bei humanen MDM replizierte der Phase I-Stamm H deutlich geringer als das Phase II-Isolat NmII. Es ist bekannt, dass das Fehlen eines intakten Immunsystems die Replikation von Phase II-Partikeln in Zellkultursystemen begünstigt (Miller et al. 2004). Allerdings zeigte sich beim Vergleich beider Nm-Phasentypen, dass NmI in bovinen MDM besser replizierte als NmII, während sich NmII effizienter in humanen MDM vermehrte. Da es sich bei dem NmI um ein Phasengemisch mit gleichen Anteilen an Phase I und II handelt, können Varianzen in den Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden. Jedoch sind die Unterschiede zwischen den beiden LPS-Phasentypen (H, NmII) und den Nm-Phasenvarianten gering. Auch in anderen Studien mit humanen Makrophagen (primäre Zellen und Zelllinien) konnten keine starken quantitativen Unterschiede in der Replikation zwischen NmI und II nachgewiesen werden (Howe et al. 2010). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die als Phasengemisch identifizierten Stämme mit einem höheren Anteil an Phase I-Partikeln sich in bovinen MDM effizienter replizierten als Stämme mit einem Überschuss an Phase II-Partikeln. Diese Ergebnisse spiegelten nicht die Replikationseffizienz der Stämme H (Phase I) und NmII (Phase II) wider. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass der LPS-Phasentyp in der Zellkultur ohne das Einwirken eines intakten Immunsystems einen geringen Einfluss auf das Replikationsverhalten der Bakterien ausübt. Zudem beeinträchtigt die Varianz der Phasentyp-Anteile innerhalb der Inokula die Auswertbarkeit und Vergleichbarkeit mit anderen publizierten Arbeiten. Daraus geht hervor, dass der LPS-Phasentyp nicht für die Beurteilung der Replikationseffizienz bei Coxiellen geeignet ist.

Diskussion

Weiterhin wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ursprungswirt der einzelnen Isolate und der Replikationseffizienz besteht (Abbildung 14). Es ist zu vermuten, dass Isolate in ihrem Ursprungswirt bzw. in artverwandten Wirten effizienter replizieren als in einem Fehlwirt. Ein speziesspezifischer Tropismus zwischen dem Isolat und dem Wirt konnte nicht festgestellt werden. So replizierten humane Isolate in beiden MDM-Spezies mit einer erhöhten Effizienz und Wiederkäuerisolate vermehrten sich in humanen MDM effizienter als in ihrem Ursprungswirt. Das Zeckenisolat Nm replizierte sich im Vergleich zu den anderen Stämmen in beiden MDM-Kulturen gleichermaßen gut. Zecken spielen als Vektoren eine wichtige Rolle in der Transmission zwischen den Wirten (Mensch, Wild- und Nutztiere). So ist bekannt, dass Coxiellen in Zellkulturen der Schildzecke (*Ixodidae*) mit einer erhöhten Effizienz replizieren und auch infektiös für andere Säugetierzellen sind (Herrin et al. 2011). Die in den bovinen und humanen MDM beobachtete speziessunabhängige Replikation der Stämme kann mit dem Vektorpotential der Zeckenisolate in Verbindung stehen.

Der Mensch ist im Infektionskreislauf der Coxiellen ein Fehlwirt. In den letzten Q-Fieber-Ausbrüchen von 1980 bis 2000 wurden humane Fälle vermehrt durch Wiederkäuer, insbesondere Schafe, Ziegen und Rinder, verursacht (Tissot-Dupont et al. 2004). Auch beim letzten großen Q-Fieber-Ausbruch in den Niederlanden (2009-2011) wurde die Transmissionsroute auf den Menschen durch Schafe und Ziegen begründet. In diesem Ausbruch konnten 3 Genotypen identifiziert werden, die sowohl beim Menschen als auch bei Schafen, Ziegen sowie Rindern isoliert wurden (Tilburg et al. 2012). Daraus lässt sich schließen, dass der Ursprungswirt eines *C. b.*-Stammes kein geeigneter Parameter zur Vorhersage der Replikationseffizienz der Bakterien darstellt.

Die Invasionsrate der Bakterien ist ein weiterer Faktor, der die Replikation von *C. b.* definiert. Eine theoretisch bestimmte Bakterienmenge nach 1 h Inokulation zeigte zwischen den beiden MDM-Kulturen stammspezifische Unterschiede auf. Um Zusammenhänge zwischen dem Invasionsvermögen und den einzelnen Stämmen abzuleiten, wurden die berechneten Invasionsraten den MLVA-Gruppen, dem Phasentyp sowie dem Isolationsort der *C. b.*-Stämme gegenübergestellt. Es konnte keine eindeutige Korrelation zwischen dem Genotyp und der Invasivität der Bakterien ermittelt werden. Dagegen wurde bereits beschrieben, dass Phase II-Partikel sowohl phagozytierende als auch nicht phagozytierende Zellen effizienter invadieren als Phase I-Partikel (Ghigo et al. 2009, Moos und Hackstadt 1987). Die Gegenüberstellung der Invasivität mit dem LPS-Phasentyp der *C. b.*-Stämme konnte keine gesteigerte Aufnahme von Phase II-Partikeln durch bovine oder humane MDM aufzeigen (Abbildung 15). Das Phase I-Isolat H sowie die Stämme mit einem Überschuss an Phase I-LPS konnten beide MDM-Kulturen stärker invadieren als NmII oder Phasengemische mit einem höheren Anteil an Phase II-LPS. Gründe für die Unterschiede könnten in der Zusammensetzung der Inokulate liegen. Die Ermittlung der *C. b.*-Partikelzahl in den Konserven er-

folgte durch Auszählung eines Giménez-gefärbten Präparates, wo sowohl lebende als auch tote Partikel gezählt werden. Die prozentualen Anteile von lebenden und toten Bakterien im Inokulat können dabei variieren und rückwirkend nicht definiert werden. Somit kann eine Beeinflussung nicht ausgeschlossen werden. Umso interessanter war dagegen die Beobachtung, dass ein Zusammenhang zwischen dem Invasionsvermögen der *C. b.*-Stämme und der jeweiligen Spezies zu bestehen scheint, von dem die Stämme ursprünglich isoliert wurden. So konnten die höchsten Invasionsraten bei humanen Isolaten (H, S) sowie dem Nagerisolat D und die niedrigsten Raten bei den verschiedenen Wiederkäuerisolaten festgestellt werden. Dieses Phänomen ließ sich in humanen wie bovinen MDM gleichermaßen beobachten. Eine Korrelation zwischen dem Invasionsvermögen und der Replikationseffizienz konnte jedoch nicht abgeleitet werden. Dies wurde besonders am Nager-Isolat D deutlich, welches in beiden MDM-Spezies trotz hoher Invasivität kaum replizierte. Somit könnte der Genotyp das größte Potential haben, als Biomarker zur Beurteilung der Virulenz von *C. b.* verwendet zu werden.

8.5 Immunmodulatorische Reaktion der bovinen MDM nach einer Infektion mit *C. b.*

Damit Pathogene in Makrophagen überleben können, müssen sie Strategien entwickeln, die den Abwehrmechanismen des Immunsystems entgegenwirken. Bei Coxiellen ist bekannt, dass die Erreger das Immunsystem aktiv modulieren (Waag 2007). Um die Wirtszellreaktion von infizierten bovinen MDM zu untersuchen, wurde die Expression diverser immunmodulatorischer Zytokine und Chemokine während der Replikation von Nm-Varianten (Phase I und II, hitzeinaktivierte Nml-Form) bestimmt. Über den Untersuchungszeitraum von 7 d konnte eine dominierende Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , IL-12 und TNF- α , 3 h *p. i.* nachgewiesen werden. Die frühe Stimulation der Makrophagen könnte eine Folge der bakteriellen Adhärenz an wirtseigenen PRRs sein, die zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems und zur Eliminierung des Pathogens führen (Kumar et al. 2011). Typische Rezeptoren können u. a. TLR2 (Zamboni et al. 2004) oder Integrine, wie $\alpha_v\beta_3$, (Dellacasagrande et al. 2000) sein. Eine frühe Aktivierung von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 α , IL-12) wurde ebenfalls in infizierten humanen Monozyten und murinen Makrophagen nachgewiesen (Dellacasagrande et al. 2000, Tujulin et al. 1999). Diese erfolgte nachweislich durch die bakteriellen Adhärenz an die Wirtszelle und wurde nicht durch die Internalisierung der Coxiellen gesteuert (Dellacasagrande et al. 2000).

In bovinen MDM sank trotz aktiver Replikation die Zytokinexpression nach der frühen Aktivierung erheblich ab und erreichte 3 d *p. i.* das Expressionsprofil einer nicht infizierten Zelle. Diese Reduktion konnte sowohl bei einem aktiven als auch hitzeinaktivierten Nml nachgewiesen werden und verläuft somit unabhängig von der metabolischen Aktivität der Coxiellen.

Diskussion

Bei Legionellen ist bekannt, dass die frühe Stimulation der Wirtszelle durch die Bindung von bakteriellen Hitzeschock-Proteinen (Hsp's) an Zellrezeptoren erfolgt (Retzlaff et al. 1996). Auf der Oberfläche von Coxiellen ist ebenfalls ein Hsp lokalisiert, welches Homologien zu Hsp's von Legionellen aufweist (Macellaro et al. 1998). Somit könnte die frühe Expression von Th1-spezifischen Zytokinen durch *C. b.*-spezifische Hsp's erfolgen. Th2-spezifische Zytokine (IL-10 und MCP-1) wurden dagegen nur geringfügig mit einer erhöhten Konzentration 3 h *p. i.* transkribiert. Die Bildung von Th2-spezifischen Immunmodulatoren, wie IL-10 und MCP-1, wird häufig bei Patienten mit einem chronischen Q-Fieber nachgewiesen (Meghari et al. 2008, Meghari et al. 2006). Daraus lässt sich schließen, dass bovine MDM in Folge der bakteriellen Adhärenz mit einer frühen pro-inflammatorischen Wirtszellantwort auf eine *C. b.*-Infektion reagieren.

Antimikrobielle Immunmodulatoren, wie IFN- γ , iNOS und das Pyrogen IL-1 β wurden während der Infektion mit Nm-Varianten ebenfalls in bovinen MDM exprimiert. IFN- γ ist ein wichtiges Zytokin für die Eliminierung von intrazellulären Erregern (Jin et al. 2004). In *C. b.*-infizierten bovinen MDM-Kulturen konnte 3 d *p. i.* ein Anstieg in der IFN- γ -Transkription nachgewiesen werden. IFN- γ wird hauptsächlich von NK-Zellen sowie T-Zellen exprimiert und sezerniert (Schroder et al. 2004), während die Fähigkeit von Makrophagen zur IFN- γ -Expression lange Zeit in Frage gestellt wurde. Studien belegen jedoch, dass Makrophagen konstitutiv IFN- γ exprimieren und nach Aktivierung durch verschiedene physiologische Faktoren das Zytokin sezernieren (Gessani und Belardelli 1998). Eine IFN- γ -Expression konnte zudem sowohl in bovinen als auch in humanen MDM nach Stimulation mit *E. coli* LPS oder Inokulation mit *C. b.* festgestellt werden. Eine Verunreinigung der Zellkulturen scheint hierbei keine prägnante Relevanz zu haben. Dies begründet sich damit, dass die Zellkulturen vor und während der Infektions- und Stimulationsversuche mehrfach gewaschen und somit mögliche T-Zellen eliminiert wurden. Weiterhin spricht dafür, dass bei beiden Makrophagenspezies trotz unterschiedlicher Präparationstechniken eine IFN- γ -Produktion nachweisbar war. Die im Vergleich zu einer *E. coli*-LPS-Stimulation (24 h *p. s.*) zeitlich verzögerte IFN- γ -Expression in *C. b.*-infizierten bovinen MDM (3 d *p. i.*) kann durch das Erreichen eines Schwellenwertes verursacht worden sein (Tabelle 15). Extrazelluläre Einflüsse, wie die Stimulation durch PAMPS oder IL-12 führen zu einer vermehrten Sezernierung von IFN- γ , was wiederum die autoregulatorische mRNA-Expression des Zytokins anregt (Gessani und Belardelli 1998). Die PAMP-Konzentration in der eingesetzten *E. coli* LPS-Lösung könnte eine höhere Dichte aufgewiesen haben als die in einer *C. b.*-Suspension, so dass der Schwellenwert in LPS-stimulierten Kulturen schneller erreicht wurde. Freies IFN- γ bewirkte in murinen Fibroblasten eine Inhibierung der Replikation von Coxiellen (Turco et al. 1984), während in bovinen MDM die *C. b.*-Replikation bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen anhält. Bovine MDM sind damit in der Lage auf eine Infektion mit *C. b.* zu reagieren und IFN- γ zu exprimieren,

jedoch scheint dieses antimikrobielle Zytokin keinen direkten Einfluss auf die Replikation der Erreger zu haben.

Durch das Einwirken von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IFN- γ) und mikrobiellen PAMPs (LPS, Lipoteichonsäure) exprimieren Makrophagen vermehrt iNOS (Howe et al. 2002, Flannagan et al. 2009). IFN- γ induziert im Zusammenspiel mit TNF- α die Expression von iNOS in murinen Makrophagen und inhibiert somit die Replikation sowie die Reifung der PV. Die Konzentration von TNF- α ist hierbei entscheidend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und damit für die antimikrobielle Wirkung (Howe et al. 2002). In bovinen MDM bewirkte die *C. b.* Infektion eine frühe iNOS-Transkription (3 h *p. i.*), die mit der exprimierten TNF- α -Menge korrelierte. So transkribierten Nml-infizierte bovine MDM mit einer hohen TNF- α -Expression ebenso vermehrt das *iNOS*-Gen. Im Vergleich dazu führte eine Stimulation mit einem inaktiven Nml zu einer deutlich geringeren TNF- α - und iNOS-Expression. Im weiteren Verlauf der Infektion sank die Expression von iNOS sowie TNF- α trotz Replikation von Nml erheblich ab. Daraus geht hervor, dass eine *C. b.*-Infektion in bovinen MDM zu einer frühen Transkription von iNOS und TNF- α führen, die jedoch keinen Einfluss auf die Vermehrung der Erreger hat.

IL-1 β wirkt als eines der stärksten endogenen Pyrogene und spielt eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Pathogenen (Dinarello 1997). Die Sezernierung von IL-1 β wird im Vergleich zu anderen Zytokinen streng kontrolliert und erst nach post-translationaler Modifikation durch Caspase 1 von der Zelle freigesetzt (Dinarello 2007, van de Veerdonk et al. 2011). Die Bestimmung des aktiven Proteins im Überstand gibt daher eine eindeutigere Auskunft über die pro-inflammatorische Wirkung von IL-1 β als die exprimierte mRNA. In bovinen MDM wurde nach Stimulation mit *E. coli* LPS 24 h *p. s.* eine Konzentration von 980 pg/ml des sezernierten aktiven IL-1 β Protein nachgewiesen. Eine Infektion mit Nml oder II bzw. eine Stimulation mit einem hitzeinaktivierten Nml führten zu keiner Freisetzung des Proteins, was in keiner Relation zur exprimierten mRNA-Menge stand. Auch intrazellulär konnte das Vorläuferprotein und seine proteolytischen Spaltungsformen ausschließlich nach *E. coli* LPS-Stimulation vermehrt nachgewiesen werden (Abbildung 17). An der Inhibierung der IL-1 β Translation könnten u. a. regulatorische miRNAs beteiligt sein. miRNAs beschreiben kleine, hochkonservierte regulatorische RNAs, die nicht für ein Protein kodieren. Sie werden nach einer Stimulation gebildet und können die Expression von verschiedenen Proteinen beeinflussen, indem Target-mRNAs post-transkriptionell zerstört oder die Translation inhibiert wird (Bartel 2004, Eulalio et al. 2008). Bakterielle Effektorproteine können die Funktion der miRNA beeinflussen (Navarro et al. 2008). Somit wäre eine Steuerung der zellulären miRNA durch *C. b.*-spezifische Effektorproteine denkbar. Diese Proteine müssten zudem hitzestabil sein, da eine hitzeinaktivierte Nml-Suspension ebenfalls die IL-1 β -Translation beeinflusste. Bei anderen intrazellulären Erregern, wie Mykobakterien, ist beschrieben, dass in humanen Makro-

phagen die enzymatische Spaltung von IL-1 β in das aktive Protein nicht durch die bakterielle Stimulation der Zelle, sondern über den Rezeptor P2X7 gesteuert wird (Kleinnijenhuis et al. 2009). Auch verschiedene gram-negative Bakterien regulieren über P2X7 die Freisetzung von IL-1 β (Yilmaz et al. 2008). Der Purino-Rezeptor P2X7 wird durch extrazelluläres ATP aktiviert und führt zur Inflammasombildung sowie zur Aktivierung der Caspase 1 (Wiley et al. 2011). ATP als wichtiger Immunmodulator liegt in hohen Konzentrationen im Zellzytoplasma vor und wird durch die Zerstörung der Zellen freigesetzt (Vitiello et al. 2012). Anders als bei Monozyten liegt Caspase 1 in Makrophagen nicht konstitutiv aktiviert vor, sondern muss über ATP stimuliert werden (Netea et al. 2009). Die in den bovinen MDM gemessene IL-1 β -Konzentration nach einer *E. coli* LPS-Stimulation konnte somit nur in Folge einer Bindung von ATP an den P2X7-Rezeptor freigesetzt werden. Das exogene ATP könnte sich durch zerstörte Lymphozyten im Medium der MDM-Kultur angereichert haben. Des Weiteren induziert IFN- γ eine vermehrte Freisetzung von ATP in Makrophagen (Netea et al. 2009). IFN- γ konnte in bovinen MDM in geringen Mengen nachgewiesen werden und könnte ebenfalls an der Aktivierung des P2X7 Rezeptors bzw. der Caspase 1 beteiligt sein. Mykobakterien sekretieren zwei ATP-degradierende Proteine, die das exogene ATP zerstören und somit die Aktivierung der enzymatischen Kaskade inhibieren, die zu einer Reifung des IL-1 β Proteins führt (Zaborina et al. 1999). Bei Legionellen erfolgt die Inhibierung der Caspase 1 durch einen flagellinunabhängigen Prozess, welcher durch ein Effektorprotein ausgelöst wird, welches in Coxiellen ebenfalls vorkommt (Retzlaff et al. 1996). Das Protein CBU1823 wird über das Typ IV-Sekretionssystem sezerniert und inhibiert auf einen noch unbekanntem Weg die Aktivität von Caspase 1 (Newton et al. 2013, Zamboni 2011). Es wäre denkbar, dass dieses Protein in Makrophagen ebenfalls den Einstrom von freiem ATP in die Zelle verhindert. Dieses könnte die Inhibierung der Spaltung des IL-1 β Vorläuferproteins erklären, welches nur in geringen Konzentrationen nach der Infektion mit *C. b.* in bovinen MDM vorlag.

Die Bedeutung dieser *In vitro*-Befunde für den Infektionsverlauf im Wiederkäuer kann nur vorsichtig beurteilt werden, jedoch ist weder in infizierten CB-17 Mäusen noch in Patienten mit akutem Q-Fieber vermehrt IL-1 β im Serum nachweisbar (Russell-Lodrigue et al. 2009, Capo et al. 1999a). Somit besteht die Möglichkeit, dass Coxiellen die IL-1 β -Expression sowohl auf post-transkriptioneller als auch auf post-translationaler Ebene beeinflussen. Da besonders sezernierte pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF oder INF- γ , eine autoregulatorische Wirkung auf die Expression von weiteren Zytokinen oder Chemokinen der Makrophagen haben (Ma et al. 1996), müsste theoretisch die Transkription von Immunmodulatoren im weiteren Verlauf der *C. b.*-Infektion in bovinen MDM immer weiter ansteigen. Dies konnte jedoch nur in *E. coli*-stimulierten bovinen MDM bestätigt werden (Tabelle 11). Im Gegensatz dazu lässt sich nach der frühen Aktivierung der pro-inflammatorischen Wirtszellantwort eine signifikante Reduktion der Zytokin- und Chemokin-Expression in *C. b.*-infizierten bovinen

MDM beobachten. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die *C. b.*-Infektion auch die Sezernierung von anderen Zytokinen und Chemokinen beeinflusst.

Unterschiede in der Expression der Immunmodulatoren wurden zwischen den LPS-Phasentypen ersichtlich. Im Allgemeinen werden gram-negative Bakterien mit einem glatten LPS im Vergleich zu Bakterien mit einem rauen LPS vom wirtseigenen Immunsystem kaum erkannt und weisen somit eine verstärkte Virulenz auf (Jimenez de Bagues et al. 2004). In der vorliegenden Untersuchung induzierte NmII im Gegensatz zum Phase I-Stamm NmI 3 h *p. i.* eine deutlich geringere Menge an pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. In humanen DCs repliziert NmI ohne die Zelle zu aktivieren wohingegen das verkürzte LPS von NmII die Reifung der DCs fördert und eine erhöhte Expression von IL-12 und TNF- α induziert (Shannon et al. 2005b). Humane DC's unterscheiden sich damit von humanen und murinen Makrophagen, wo keine Unterschiede in der Reaktion gegenüber den Phasentypen nachgewiesen werden konnte (Howe et al. 2010, Tujulin et al. 1999). Eine Erklärung für die Unterschiede ist im Detail derzeit noch nicht möglich. Das LPS der Coxiellen spielt in der Induktion der Immunantwort eine entscheidende Rolle. In der TLR2-abhängigen Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wird das Lipid A als ein möglicher Aktivator genannt. Jedoch unterscheidet sich das LPS von NmI zu NmII strukturell nicht im Lipid A-Anteil (Zamboni et al. 2004). Andere Faktoren scheinen somit eine Rolle zu spielen. So ist bekannt, dass die Intensität der bakteriellen Adhärenz an die Zelloberfläche die Expression von TNF- α beeinflusst (Dellacasagrande et al. 2000). Das in den bovinen MDM theoretisch bestimmte Invasionsvermögen (Tabelle 14) wies erhebliche Unterschiede zwischen beiden Nm Phasenvarianten auf. So adhärirten NmI-Partikel 1 h *p. i.* mit einer 70-fach höheren Rate an der Oberfläche als NmII. Die damit unterschiedlich intensive Induktion der von den Oberflächenrezeptoren ausgehenden Signaltransduktion könnte ein Grund für die Expressionsunterschiede der Immunmodulatoren sein.

Zusammenfassend konnte eine Beeinflussung der Wirtszellreaktion durch die Infektion mit *C. b.* in bovinen MDM festgestellt werden, welche sich förderlich auf die Replikation der Bakterien auswirkte. Die Inhibierung der Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen sowie Chemokinen während der Replikation, wie auch die gehemmte Freisetzung des aktiven IL-1 β -Proteins verdeutlichen die *C. b.*-induzierte Immunsuppression. Das Nichteingreifen des Immunsystems in das Infektionsgeschehen fördert eine persistente Infektion und könnte eine Erklärung für die häufig dokumentierte Dauerausscheidung der Bakterien bei Milchkühen sein.

8.6 *C. b.*-bedingte Immunreaktion der bovinen und humanen MDM

In immunkompetenten Wirten wird die akute Coxiellen-Infektion über eine T-Zell-vermittelte Immunantwort kontrolliert. Dabei ist die Aktivierung der Th1-Zellen essentiell für die Eindämmung der Bakterien durch die Bildung von Granulomen und einer verstärkten Sezernierung von IFN- γ (Shannon und Heinzen 2009, Capo und Mege 2012). In bovinen und humanen MDM konnte nach Infektion mit verschiedenen *C. b.*-Isolaten eine dominierende Expression von Th1-spezifischen Zytokinen, wie IL-1 β , IL-12 und TNF- α , 3 h *p. i.* nachgewiesen werden. Diese variierte spezies- und stammspezifisch. In bovinen MDM lag die Intensität der transkribierten Immunmodulatoren deutlich höher als in den humanen Zellen (Tabelle 17, Tabelle 19). Dieser Unterschied beruhte nicht auf der allgemeinen Reaktivität der Zellen, da die Stimulation von humanen MDM mit *E. coli* LPS zu einer deutlich höheren Zytokinexpression führte als die von bovinen MDM (Tabelle 11). Beim Vergleich der exprimierten Immunmodulatoren wurden erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen ersichtlich. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in immunkompetenten Mäusen nachgewiesen werden (Kubes et al. 2006, Russell-Lodrigue et al. 2009). Unterschiede in der Sekretion von Immunmodulatoren beeinflussen erheblich den Infektionsverlauf und können somit Auskunft über die Virulenz eines Erregers geben. In CB-17 Mäusen führte die Infektion mit verschiedenen *C. b.*-Stämmen zu einer genotypspezifischen Sekretion von Zytokinen. Dabei erzeugten Stämme wie *Nml*, *Ohio* oder *African* (RLFP-Gruppe I) eine starke kontinuierliche Induktion der Immunantwort über einen langen Zeitraum. Andere Gruppen mit Isolaten wie *Priscilla* und *Scurry* (RLFP-Gruppe IV und V; beide Stämme MLVA-Typ II) exprimierten nur mäßig Zytokine während der klinisch apparenten Phase (7-14 d *p. i.*) (Russell-Lodrigue et al. 2009). Die in bovinen und humanen MDM beobachteten Unterschiede in der Zellreaktion auf verschiedene Isolate wurden deshalb mit Hilfe einer hierarchischen Clusteranalyse auf eine mögliche Korrelation mit dem *C. b.*-Genotyp untersucht. In bovinen MDM konnten drei Gruppen definiert werden (Abbildung 22). Abhängig von der Zellreaktion grenzten sich zwei Hauptgruppen mit einer starken (u. a. *Nml*, *H*, *D*, *S*) und einer schwachen Zytokinexpression (u. a. *Cb 30/14*, *Cb 71/3*) ab. Innerhalb der Gruppe, die zu einer schwachen Wirtszellreaktion führte, nahm der Stamm *Cb 30/14* eine Sonderstellung ein. Der ovine Stamm löste neben einer sehr geringen Zellreaktion zusätzlich eine im Vergleich zu den anderen Isolaten und *E. coli* LPS erhöhte IFN- γ -Transkription aus. IFN- γ inhibiert das Wachstum der Coxiellen und begünstigt die Freisetzung von TNF- α sowie die Induktion des Zelltods (Turco et al. 1984, Dellacasagrande et al. 1999). Obwohl eine Korrelation zwischen dem bakteriellen Wachstum und IFN- γ bei anderen Stämmen nicht nachgewiesen werden konnte, war die Replikation von Stamm *Cb 30/14* mit einer Replikationsrate von 0,86 auffallend niedrig.

Die Einteilung der *C. b.*-Stämme nach Infektion humaner MDM erfolgte in vier Gruppen. Das caprine Isolat *Cb 19/34* unterschied sich deutlich von den anderen Stämmen (Abbildung 22)

und induzierte neben einer sehr geringen Th1-spezifischen Immunantwort gleichzeitig eine stark erhöhte Expression von MCP-1 (Tabelle 19). Das Chemokin MCP-1 ist für die Aktivierung von Th2-Zellen verantwortlich. (Chensue et al. 1996). Ein Vergleich mit dem Expressionsprofil nach einer *E. coli* LPS-Stimulation in humanen MDM macht deutlich, dass Cb 19/34 eine dominierende Th2-spezifische Immunantwort induziert. In anderen Studien mit humanen Makrophagen wurde die Aktivierung der Th2-Antwort mit einer moderaten Replikation und Persistenz der Erreger in Verbindung gebracht (Benoit et al. 2008b). In der vorliegenden Studie korrelierte eine Th2-lastige Immunreaktion humaner MDM mit einer im Vergleich zu den anderen Stämmen nur mäßigen Replikationsfähigkeit des Stammes Cb 19/34.

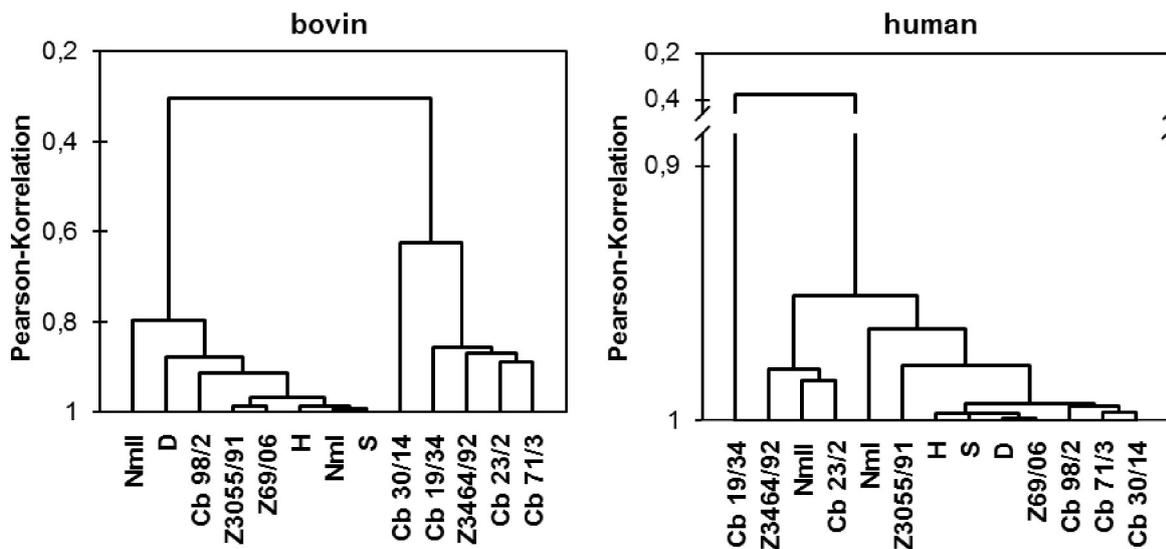


Abbildung 22: Vergleichende Analyse der *C. b.*-induzierten Reaktion in bovinen und humanen MDM. Dargestellt sind hierarchische Clusteranalysen der *C. b.*-Stämme anhand der induzierten Zytokin- und Chemokin-Expression.

Auch nach Gruppierung der Stämme gemäß ihrer MLVA-Genotypen zeigte sich eine klare Korrelation zwischen dem MLVA-Typ und der Immunreaktion, die unabhängig von der Spezies verlief (Tabelle 18). So führte in bovinen und humanen MDM eine Infektion mit dem MLVA-Typ I (Cb 23/2, Cb 19/34, Cb 30/14, Z3464/92) zu einer schwachen Zytokin- und Chemokin-Expression. Eine Ausnahme stellte hier lediglich die Expression von IFN- γ und MCP-1 in humanen MDM dar. Stämme des MLVA-Typs II (S, Z3055/91) induzierten dagegen eine milde Zellreaktion in beiden MDM-Kulturen. Eine Infektion mit Stämmen des MLVA-Typs III (D, Cb 71/3, Cb 98/2, Z69/06) führte in bovinen MDM zu einer milden bis hohen Wirtszellreaktion. Im Vergleich zu den anderen Stämmen des Genotyps III induzierte das Isolat D eine deutlich erhöhte Zytokin- und Chemokin-Expression. CB-17 Mäusen, welche ebenfalls mit dem Stamm D inokuliert wurden, reagierten nur mit einer sehr schwachen Immunantwort auf die Infektion (Russell-Lodrigue et al. 2009), wobei dieser Unterschied mit den verschiedenen Isotypen des Stammes D (siehe 8.2) in Verbindung stehen könnte. Eine

Infektion mit Stämmen des MLVA-Typs III (D, Cb 71/3, Cb 98/2, Z69/06) führte in humanen MDM zu einer deutlich höheren Zellreaktion als mit Stämmen des MLVA-Typs I sowie II. Sowohl in humanen als auch in bovinen MDM wurde ersichtlich, dass der MLVA-Typ IV (NmI, H) die stärkste Wirtszellantwort bei den Makrophagen induzierte. Im Vergleich dazu reagierten lediglich NmII-infizierte MDM deutlich reduziert, so dass hier die Wirtszellreaktion stärker vom LPS-Phasentyp als vom Genotyp abzuhängen scheint.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen *in vivo* (Russell-Lodrigue et al. 2009) korrelierte die Reaktion von MDM *in vitro* mit dem Genotyp der *C. b.*-Stämme, welche jedoch unabhängig von der *C. b.*-Replikation verlief. So zeigten Stämme des MLVA-Typs III (D, Z69/06) und IV (Nm, H) trotz erhöhter Zellreaktion starke Unterschiede in der Wachstumskinetik auf. Dies spiegelt nicht die Beobachtungen in infizierten CB-17 Mäusen wider, wo der Genotyp der *C. b.*-Stämme mit der Bakteriendichte in der Milz und der pro-inflammatorischen Immunantwort korrelierte (Russell-Lodrigue et al. 2009). Ob die Ursache für diese Unterschiede in speziesspezifischen Besonderheiten liegt oder besondere Charakteristika der Interaktion von *C. b.* mit Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems im Allgemeinen reflektiert, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

8.7 Einfluss verschiedener *C. b.*-Stämme auf die Expression von Oberflächenmarkern der MDM

Die Aktivierung einer T-Zell-vermittelten adaptiven Immunantwort erfolgt über die Bindung des T-Zell-Rezeptors an antigenpräsentierenden Strukturen (MHC I und II) auf Makrophagen sowie über T-Zell-Oberflächenmoleküle (u. a. CD28, CD154) an ko-stimulierende Faktoren (u. a. CD40, CD80, CD86) oder Adhäsionsmoleküle (CD54, CD58) (Aimanianda et al. 2009). PAMPs induzieren bei Makrophagen eine vermehrte Expression dieser Oberflächenmarker. Intrazelluläre Bakterien, wie Mykobakterien, können jedoch die Aktivierung ihrer Wirtszelle inhibieren und somit das Immunsystem umgehen (Davidson et al. 2011, Geijtenbeek et al. 2003). Bei Coxiellen ist bekannt, dass vor allem avirulente Phase II-Stämme die Aktivierung von humanen DC fördern (Shannon et al. 2005b). Die Expression von immunmodulatorischen Oberflächenmarkern wurde in bovinen MDM 24 h *p. s.* mit *E. coli* LPS, NmI sowie einem hitzeinaktivierten NmI Stamm untersucht. Das Oberflächenprotein CD80 wurde in bovinen MDM ausschließlich nach Stimulation mit *E. coli* LPS vermehrt exprimiert. Die Expression von CD86, MHC I und MHC II blieb trotz Stimulation der Zellen weitgehend unverändert. Die Stimulation mit *E. coli* LPS sowie die Inokulation mit NmI und einer hitzeinaktivierten Suspension von NmI erhöhte jedoch die Expression von CD40 24 h *p. s.* Die vermehrte Expression des Proteins führt nach Bindung von CD154 auf T-Zellen u. a. zur Aktivierung der humoralen Immunantwort und zur Bildung von antikörperproduzierenden B-Plasmazellen (Elgueta et al. 2009). Der annähernd gleiche Einfluss von lebenden und inaktiven NmI-

Partikeln auf die CD40-Proteinmenge zeigt, dass die Expression der Oberflächenmoleküle eine Folge der bakteriellen Zelladhärenz ist und unabhängig von der Replikation verläuft.

In humanen DCs konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Zellen abhängig vom LPS-Phasentyp ist und nicht durch den Chemotyp von *C. b.* beeinflusst wird (Shannon et al. 2005b, Shannon et al. 2005a). Nach Infektion von bovinen und humanen MDM mit verschiedenen *C. b.*-Stämmen induzierten nur einzelne Isolate die vermehrte Expression von CD40 und CD80. Ein Bezug zum Genotyp der Stämme wurde nicht ersichtlich. Jedoch konnte in bovinen MDM eine Beeinflussung durch den LPS-Phasentyp nachgewiesen werden. Die Konzentration von CD40 wurde durch die Infektion mit NmII deutlich reduziert. Dagegen verursachte der virulente Phase I-Stamm H eine 2,6-fach erhöhte CD40-Expression. Die in den humanen DCs beschriebene Spezifität von Phase II zur effizienteren Zellaktivierung konnte in diesem Zusammenhang bei bovinen MDM nicht festgestellt werden.

Während einer Coxiellen-Infektion geht die Aktivierung der Oberflächenproteinexpression nicht von Lipid A aus (Zamboni et al. 2004), sondern von der Bindung von Lipoproteinen oder Lipopeptiden an TLR2 (Shannon et al. 2005b). In humanen DC wird die Inhibierung der Zellreifung nach Infektion mit *C. b.* mit einer Maskierung des TLR2-Rezeptors durch die Bakterien beschrieben (Shannon et al. 2005b). Ob die Inhibierung über ein sekretiertes Molekül oder bakterielle Oberflächenmoleküle verläuft, ist derzeit noch unbekannt. Das Oberflächenmolekül Com 1 induziert bei humanen DCs die Expression von diversen Ko-Faktoren, wie CD40, CD80 und CD86 (Wang et al. 2011). Ein Vergleich der Com 1-Sequenzen verschiedener *C. b.*-Stämme ergab Unterschiede auf Nukleotid- und Aminosäureebene. Anhand der Unterschiede wurden 21 *C. b.*-Stämme in 4 Gruppen eingeteilt (Zhang et al. 1997). Stammspezifische Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen wären demnach denkbar, konnten aber in den bovinen und humanen MDM nicht direkt nachgewiesen werden. Insgesamt wurde eine eindeutige Aktivierung der bovinen und humanen MDM nach Infektion mit *C. b.* nicht ersichtlich. Zusammen mit der abfallenden pro-inflammatorischen Wirtszellreaktion während der Replikation von *C. b.* in bovinen MDM, würde dies die ausbleibende Aktivierung des Immunsystems im Wirt untermauern und wäre eine Erklärung für die Dauerausscheidung der Erreger besonders bei Milchkühen.

8.8 Interaktion zwischen *C. b.* und bovinen Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen stellen die erste Barriere in der frühen Immunantwort dar (Marriott und Dockrell 2007). Coxiellen werden über die Atemwege aufgenommen (Maurin und Raoult 1999) und sind nachweislich in den Alveolarmakrophagen lokalisiert (Khavkin und Tabibzadeh 1988). Somit spielen diese Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Q-Fieber. Bovine Alveolarmakrophagen wiesen eine Affinität zu *C. b.* auf und konnten mit den Stämmen NmI, NmII sowie H infiziert werden. Die Wachstumsrate veränderte sich

Diskussion

zwischen den Isolaten nur geringfügig (Abbildung 16). Während die Anzahl der Genomkopien bei Nml um eine log-Stufe im Beobachtungszeitraum zunahm, war eine Replikation der Stämme NmII und H in den Zellen nicht nachweisbar. Im Vergleich dazu replizierten diese Stämme in bovinen MDM deutlich effizienter. Auch in humanen Alveolarmakrophagen vermehrte sich *C. b.* effizienter als in bovinen Alveolarmakrophagen (Graham et al. 2013). Beim Menschen ist eine *C. b.*-Primärinfektion gekennzeichnet durch grippeähnliche Symptome, die mit der Lokalisation der Coxiellen in der Lunge assoziiert ist (Maurin und Raoult 1999). Dagegen verläuft die Infektion bei Rindern meist latent mit nur selten auftretenden Symptomen, wie Fruchtbarkeitsstörungen oder Aborten (Woldehiwet 2004). Während einer akuten Infektion im Rind wurde Coxiella-Antigen vermehrt im Euter und in der Plazenta nachgewiesen (To et al. 1998, Rodolakis et al. 2007, Bildfell et al. 2000). Die offensichtlich verhältnismäßig schlechte Permissivität boviner Alveolarmakrophagen für die Coxiellenreplikation könnte mit der Virulenz von *C. b.* beim Rind und dem Organtropismus in Verbindung stehen. Alveolarmakrophagen nehmen über 90 % der Immunzellen in der Lunge ein und stellen somit die primären Zellen in der Produktion von Immunmodulatoren dar (Holt et al. 2008). Bovine Alveolarmakrophagen exprimierten nach einer Infektion mit *C. b.* eine dominierende Th1-spezifische Wirtszellantwort (Tabelle 20), welche im Vergleich zu bovinen MDM deutlich reduziert war. Unterschiede in der Transkription der Zytokine und Chemokine konnten ebenfalls zwischen den Stämmen festgestellt werden. So induzierte das Isolat H im Vergleich zu den anderen Stämmen eine stark erhöhte Expression von IL-12, TNF- α sowie iNOS. Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Beseitigung von intrazellulären Erregern (Feng et al. 1999, Howe et al. 2002) und könnten in einem immunkompetenten Wirt entscheidend auf den Infektionsverlauf von Stamm H wirken. Darüber hinaus wurde deutlich, dass zwischen dem virulenten Stamm Nml und dem avirulenten Stamm NmII mit Ausnahme von IL-1 β kaum Unterschiede in der Expression der Zytokine und Chemokine nachweisbar waren. Dagegen reagierten bovinen MDM deutlich stärker auf die Infektion mit Nml als auf NmII. Weiterhin beeinflusste die Vitalität der Bakterien die Reaktion der bovinen Alveolarmakrophagen. So induzierte ein inaktiver Nml eine deutlich höhere Transkription Th1-spezifische Zytokine und iNOS als ein aktiver Stamm. In bovinen MDM gab es dagegen kaum einen Unterschied zwischen einem aktiven und inaktiven Nml.

Eine *E. coli* LPS-Stimulation induzierte eine tendenziell stärkere Expression M1-typischer Oberflächenmarker (CD40, CD80, CD86, MHCI) auf Alveolarmakrophagen als auf bovinen MDM (Abbildung 3). Dagegen führte eine Infektion mit *C. b.* wie bei bovinen MDM zu keiner Aktivierung der Zelle. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle reagierten die Zellen auf NmII mit einer Suppression der Expression von CD40, CD80, CD86 sowie MHCII. Eine Aktivierung der Expression von M1-typischen Oberflächenmarkern durch die *C. b.*-Infektion blieb in beiden bovinen Makrophagenmodellen als auch in humanen MDM aus. In anderen Studien

wurde eine *C. b.*-induzierte atypische M2-Polarisation in humanen MDM beschrieben, die sich deutlich von einer *E. coli* LPS-geförderten M1-Polarisation unterschied (Benoit et al. 2008b). Nach einer *C. b.*-Infektion konnte vor allem eine erhöhte Transkription von M1-typischen Zytokinen und Chemokinen, wie IL-12 und RANTES, in bovinen MDM und Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden, während M2-spezifische Mediatoren, wie IL-10 und TGF- β , kaum induziert wurden. Jedoch wurde besonders bei bovinen MDM deutlich, dass die vermehrte Expression von M1-typischen Immunmodulatoren nur zu Beginn der Infektion erfolgte und im weiteren Verlauf signifikant abfiel. Zudem zeigte sich am Beispiel von IL-1 β , dass die transkribierte mRNA von den Zellen nicht in das aktive Protein umgeschrieben wurden. Anhand der Expressionsprofile der Oberflächenmarker und der Zytokine bzw. Chemokine nehmen die bovinen Makrophagenkulturen nach der Infektion mit *C. b.* ähnlich wie humane MDM einen atypischen M2-Phänotyp an. Die M2-Polarisation der Makrophagen und die anschließende Suppression der adaptiven Immunantwort wird mit der Persistenz der Coxiellen in Verbindung gebracht (Benoit et al. 2008b). Dies würde das mäßige Wachstum der Coxiellen in den beiden bovinen Makrophagenkulturen erklären. Die geringe Replikationsrate in diesen Zellen spiegelt dabei nicht die erhebliche Menge an ausgeschiedenen Erregern über die Milch, Kot oder Geburtsprodukte wider (Maurin und Raoult 1999), so dass zu vermuten ist, dass Makrophagen und insbesondere Alveolarmakrophagen nicht die Zielzelle für die Replikation der Coxiellen darstellen. Die Makrophagen könnten aber eine zentrale Rolle im Infektionsgeschehen der Coxiellen spielen, indem sie eine Transportfunktion einnehmen und die Bakterien zu dem eigentlichen Zielgewebe, wie Euter oder Plazenta, befördern.

Anhand des Vergleichs zwischen den beiden bovinen Makrophagenkulturen konnte gezeigt werden, dass Unterschiede zwischen den beiden Systemen bestehen. Besonders bei Alveolarmakrophagen beeinflusst die Umgebung des respiratorischen Systems den Phänotyp und die Funktion der Zellen. Diese Eigenschaft distanziert die Alveolarmakrophagen von anderen Makrophagenpopulationen (Hussell und Bell 2014). Als *In vitro*-Zell-System zur Beurteilung der bakteriellen Replikation und der induzierten Wirtsantwort von *C. b.* eignen sich bovine MDM aufgrund der Reproduzierbarkeit der Daten, der Verfügbarkeit der Zellen und der Präparationstechnik besser als Alveolarmakrophagen. Trotz dessen stellen Alveolarmakrophagen ein wertvolles Vergleichssystem dar, da die Reaktion der spezialisierten Zellen eher einer natürlichen Infektion entspricht als bei MDM.

8.9 Biomarker und Anwendung des *In vitro*-Modells

Zusammenfassend konnte in der Arbeit ein bovines *In vitro*-MDM-Modell etabliert werden, an welchem die Replikation von *C. b.* und die induzierte Wirtszellantwort in Rindern beschrieben werden kann. Anhand des Modells konnten Grundlagen für die Einschätzung der Virulenz von *C. b.*-Stämmen im Rind gesammelt werden. Als potentieller Biomarker wurde der Genotyp der Erreger definiert, welcher mit der Replikationseffizienz der Bakterien sowie der induzierten Wirtszellantwort korreliert. Um daraus einen eindeutigen Biomarker abzuleiten, müssen Versuche mit einer höheren Anzahl an Stämmen pro Genotyp sowie Versuchswiederholungen angefertigt werden. Zudem wäre die Prüfung der Immunantwort und die Ausscheidungslast der Bakterien in immunkompetenten Wirten Voraussetzung, um die Interaktion des Erregers im Wirt zu verstehen und mit dem *In vitro*-System vergleichen zu können. Mit diesen Grundlagen könnten unter Verwendung des hier entwickelten *In vitro*-Modells Rückschlüsse auf die Virulenz neu auftretender *C. b.*-Stämme bzw. ihr Gefährdungspotential im Hinblick auf die Menge der vom tierischen Wirt ausgeschiedenen Erreger und der Übertragung auf den Menschen gezogen werden.

Mit dem *In vitro*-Modell wären auch weitere Untersuchungen möglich, wie beispielsweise die Identifizierung von bakteriellen Virulenzfaktoren und deren Eignung als Biomarker oder zur Charakterisierung von molekularbiologischen Abläufen während einer *C. b.*-Infektion in Rindern. So könnten bakterielle Oberflächenfaktoren, wie das einzig bekannte Invasin OmpA oder das immunreaktive Protein Com 1, auf genetische Variationen zwischen den einzelnen Stämmen funktional untersucht und Rückschlüsse auf die stammspezifische Invasivität bzw. die Wirtsreaktion gezogen werden.

Weiterhin wäre ein genaueres Wissen über Mechanismen der bakteriellen Wirtsmanipulation nützlich, welche in den infizierten bovinen MDM beobachtet wurden. Hierzu gehört u. a. die Charakterisierung der Signalwege die zu einer Suppression der wirtseigenen Transkription bzw. Translation von Immunmodulatoren führen. Detailliertere Informationen über die Interaktion der Coxiellen mit ihrem Wirt könnten für die Etablierung neuer Wirkstoffe zur Prophylaxe (verbesserte Vakzine) oder Behandlung genutzt werden. Das Ziel für nachfolgende Forschungen sollte sein, die Ausbreitung der Erreger zu reduzieren, um Ausbrüche und die Verschleppung der Erreger in gesunde Herden zu minimieren.

9 Schlussfolgerung

Das primäre Reservoir für die Übertragung des zoonotischen Erregers *C. b.* auf den Menschen sind Schafe, Ziegen und Rinder (Maurin und Raoult 1999). Die Pathogenese von *C. b.*-Infektionen in Wiederkäuern ist weitgehend unbekannt. Infektionsstudien mit Ziegen gaben einen ersten Einblick in den Infektionsverlauf. (Roest et al. 2012). Um neue Erkenntnisse im Infektionszyklus der Erreger in Wiederkäuern zu gewinnen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein *In vitro*-System für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen *C. b.* und bovinen MDM etabliert. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass sowohl bovine MDM als auch bovine Alveolarmakrophagen mit *C. b.* infizierbar sind und eine aktive Replikation in den Zellen stattfinden kann. Die Infektion führte in beiden Zelltypen zu einer frühen Stimulation (3 h *p. i.*) mit einer erhöhten Transkription von pro-inflammatorischen Zytokinen. Dies bestätigte die Beobachtungen in murinen Makrophagen, wo ebenfalls eine frühe Aktivierung der pro-inflammatorischen Zytokinantwort nachgewiesen werden konnte (Tujulin et al. 1999). Während der Infektion in den bovinen MDM nahm die *C. b.*-induzierte Wirtsantwort unabhängig von der bakteriellen Replikation kontinuierlich ab. Eine immunsuppressive Wirkung der Bakterien konnte durch die Inhibierung der Translation sowie der Sekretion des pro-inflammatorischen Proteins IL-1 β belegt werden. Durch die Unterdrückung der Wirtszellantwort können die Bakterien ungehindert in den Makrophagen verweilen und sich replizieren. Die aktive Replikation von *C. b.* in bovinen Makrophagen bestätigt zudem den Tropismus der Erreger zu den Zellen. Jedoch steht die geringe Wachstumsrate in MDM in keiner Relation zu den hohen *C. b.*-Konzentrationen in Ausscheidungsprodukten [10^9 Bakterien/g Gewebe (Langley 1990)] von Wiederkäuern. Daraus lässt sich schließen, dass Makrophagen im Infektionszyklus von *C. b.* in Wiederkäuern als Vektoren für den Transport oder zur Persistenz der Erreger dienen könnten.

Das etablierte *In vitro*-Modell wurde für die Identifizierung von Biomarkern genutzt, welche die Virulenz von *C. b.* im Rind definieren sollten. Hierfür wurden bovine MDM mit 13 heterogene *C. b.*-Stämmen inokuliert. Diese variierten in ihren genetischen und morphologischen Eigenschaften (MLVA-, Plasmid-, Phasentyp). Eine mögliche Speziespezifität wurde zusätzlich an humanen MDM überprüft. Die Replikation von *C. b.* in MDM war stamm- und speziespezifisch. *C. b.* replizierte in humanen MDM deutlich effizienter als in bovinen MDM. Unabhängig von der Spezies korrelierte die Replikation der Stämme mit dem Genotyp und nicht mit dem LPS-Phasentyp oder der Herkunft der Isolate. Stämme der MLVA-Gruppe IV vermehrten sich in bovinen und humanen MDM besonders effizient. Dagegen replizierten Isolate der MLVA-Gruppe III am schwächsten. Diese Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen im Nagetiermodell (Russell-Lodrigue et al. 2009).

Schlussfolgerung

In Übereinstimmung mit der bereits beschriebenen genetischen Diversität der Bakterien (Beare et al. 2006) wird damit deutlich, dass die Virulenz von *C. b.* eher von den genetischen Eigenschaften des Stammes abhängt, als von der Wirtsspezies aus der das Zellmodell abgeleitet wurde.

Die durch die *C. b.*-Infektion ausgelöste Wirtsreaktion unterschied sich in der Intensität der transkribierten Zytokine bzw. Chemokine stamm- und speziesspezifisch. Die dominierende mRNA-Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen innerhalb der ersten 3 h *p. i.* korrelierte mit den Genotypen der Stämme. Isolate mit einem MLVA-Typ IV führten zu einer sehr starken Wirtszellreaktion. Dagegen reagierten MDM auf Stämme der MLVA-Gruppe I mit einer sehr schwachen Antwort. Ein Zusammenhang zwischen der Replikation und der induzierten Wirtsantwort bestand nicht. Die Expression von Aktivierungsmarkern auf Makrophagen wurde durch die Infektion mit den verschiedenen *C. b.*-Stämmen nicht erheblich verändert. Die bovinen Makrophagen polarisierten in Folge der bakteriellen Stimulation zu einem atypischen M2-Typ, wie es bereits bei humanen MDM beschrieben (Benoit et al. 2008b) und in dieser Arbeit bestätigt wurde.

Als Resultat dieser Arbeit wurde ein *In vitro*-System mit bovinen MDM etabliert, an dem die Interaktion von *C. b.* mit einem tierischen Reservoir untersucht werden kann. Aus den vorliegenden Ergebnissen wurde ersichtlich, dass die bakterielle Replikation und die induzierte Wirtszellantwort durch den Genotypen von *C. b.* entscheidend beeinflusst wird. Die Wirtsspezies spielte dagegen nur eine untergeordnete Rolle. Der Genotyp stellt somit einen potentiellen Biomarker für die Wirt-Pathogen-Interaktion zwischen *C. b.* und Wiederkäuern dar.

10 Quellenverzeichnis

- Adler H, Adler B, Peveri P, Werner ER, Wachter H, Peterhans E, Jungi TW. 1996. Differential regulation of inducible nitric oxide synthase production in bovine and caprine macrophages. *J Infect Dis*, 173 (4):971-978.
- Agger JF, Paul S. 2014. Increasing prevalence of *Coxiella burnetii* seropositive Danish dairy cattle herds. *Acta Vet Scand*, 56:46.
- Aimanianda V, Haensler J, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. 2009. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol Sci*, 30 (6):287-295.
- Altman SA, Randers L, Rao G. 1993. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog*, 9 (6):671-674.
- Amano K, Williams JC, Missler SR, Reinhold VN. 1987. Structure and biological relationships of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharides. *J Biol Chem*, 262 (10):4740-4747.
- Ammerdorffer A, Roest HI, Dinkla A, Post J, Schoffelen T, van Deuren M, Sprong T, Rebel JM. 2014. The effect of *C. burnetii* infection on the cytokine response of PBMCs from pregnant goats. *PLoS One*, 9 (10):e109283.
- Andoh M, Russell-Lodrigue KE, Zhang G, Samuel JE. 2005. Comparative virulence of phase I and II *Coxiella burnetii* in immunodeficient mice. *Ann N Y Acad Sci*, 1063:167-170.
- Andoh M, Naganawa T, Hotta A, Yamaguchi T, Fukushi H, Masegi T, Hirai K. 2003. SCID mouse model for lethal Q fever. *Infect Immun*, 71 (8):4717-4723.
- Angelakis E, Raoult D. 2010. Q Fever. *Vet Microbiol*, 140 (3-4):297-309.
- Arens M. 1979. Untersuchungen zur Charakterisierung der Phasenantigene von *Coxiella Burnetii*. Verlag:Justus Liebig-Universität.
- Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res*, 36 (3):327-349.
- Arricau-Bouvery N, Souriau A, Bodier C, Dufour P, Rousset E, Rodolakis A. 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine*, 23 (35):4392-4402.
- Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, Meyer H, Neubauer H, Rodolakis A, Vergnaud G. 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol*, 6:38.

Quellenverzeichnis

- Astobiza I, Barandika JF, Ruiz-Fons F, Hurtado A, Povedano I, Juste RA, Garcia-Perez AL. 2011. Four-year evaluation of the effect of vaccination against *Coxiella burnetii* on reduction of animal infection and environmental contamination in a naturally infected dairy sheep flock. *Appl Environ Microbiol*, 77 (20):7405-7407.
- Baca OG, Roman MJ, Glew RH, Christner RF, Buhler JE, Aragon AS. 1993. Acid phosphatase activity in *Coxiella burnetii*: a possible virulence factor. *Infect Immun*, 61 (10):4232-4239.
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116 (2):281-297.
- Beare PA. 2012. Genetic manipulation of *Coxiella burnetii*. *Adv Exp Med Biol*, 984:249-271.
- Beare PA, Samuel JE, Howe D, Virtaneva K, Porcella SF, Heinzen RA. 2006. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J Bacteriol*, 188 (7):2309-2324.
- Behrendt JH, Hermosilla C, Hardt M, Failing K, Zahner H, Taubert A. 2008. PMN-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Vet Parasitol*, 151 (2-4):97-109.
- Benoit M, Desnues B, Mege JL. 2008a. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*, 181 (6):3733-3739.
- Benoit M, Barbarat B, Bernard A, Olive D, Mege JL. 2008b. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages. *Eur J Immunol*, 38 (4):1065-1070.
- BfR. 2010. Q-Fieber: Übertragung von *Coxiella burnetii* durch den Verzehr von Lebensmitteln tierischer Herkunft unwahrscheinlich. Stellungnahme des BfR, Nr. 018/2010.
- Biberstein EL, Behymer DE, Bushnell R, Crenshaw G, Riemann HP, Franti CE. 1974. A survey of Q fever (*Coxiella burnetii*) in California dairy cows. *Am J Vet Res*, 35 (12):1577-1582.
- Bildfell RJ, Thomson GW, Haines DM, McEwen BJ, Smart N. 2000. *Coxiella burnetii* infection is associated with placentitis in cases of bovine abortion. *J Vet Diagn Invest*, 12 (5):419-425.
- Body-Malapel M, Dharancy S, Berrebi D, Louvet A, Hugot JP, Philpott DJ, Giovannini M, Chareyre F, Pages G, Gantier E, Girardin SE, Garcia I, Hudault S, Conti F, Sansonetti PJ, Chamailard M, Desreumaux P, Dubuquoy L, Mathurin P. 2008. NOD2: a potential target for regulating liver injury. *Lab Invest*, 88 (3):318-327.
- Borrello S, Nicolo C, Delogu G, Pandolfi F, Ria F. 2011. TLR2: a crossroads between infections and autoimmunity? *Int J Immunopathol Pharmacol*, 24 (3):549-556.
- Bour-Jordan H, Bluestone JA. 2009. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev*, 229 (1):41-66.

Quellenverzeichnis

- Brennan RE, Russell K, Zhang G, Samuel JE. 2004. Both inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase contribute to the control of virulent phase I *Coxiella burnetii* infections. *Infect Immun*, 72 (11):6666-6675.
- Briggs HL, Wilson MJ, Seshadri R, Samuel JE. 2005. Fur-regulated genes in *Coxiella burnetii*. *Ann N Y Acad Sci*, 1063:68-72.
- Brink N, Szamel M, Young AR, Wittern KP, Bergemann J. 2000. Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflamm Res*, 49 (6):290-296.
- Budhia S, Haring LF, McConnell I, Blacklaws BA. 2006. Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *J Immunol Methods*, 309 (1-2):160-172.
- Burnet FM, Freeman M. 1983. Experimental studies on the virus of "Q" fever. *Rev Infect Dis*, 5 (4):800-808.
- Capo C, Mege JL. 2012. Role of innate and adaptive immunity in the control of Q fever. *Adv Exp Med Biol*, 984:273-286.
- Capo C, Amirayan N, Ghigo E, Raoult D, Mege J. 1999a. Circulating cytokine balance and activation markers of leucocytes in Q fever. *Clin Exp Immunol*, 115 (1):120-123.
- Capo C, Zaffran Y, Zugun F, Houpiqian P, Raoult D, Mege JL. 1996. Production of interleukin-10 and transforming growth factor beta by peripheral blood mononuclear cells in Q fever endocarditis. *Infect Immun*, 64 (10):4143-4147.
- Capo C, Lindberg FP, Meconi S, Zaffran Y, Tardei G, Brown EJ, Raoult D, Mege JL. 1999b. Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between alphaVbeta3 integrin and CR3. *J Immunol*, 163 (11):6078-6085.
- Carcopino X, Raoult D, Bretelle F, Boubli L, Stein A. 2009. Q Fever during pregnancy: a cause of poor fetal and maternal outcome. *Ann N Y Acad Sci*, 1166:79-89.
- Cardinale E, Esnault O, Beral M, Naze F, Michault A. 2014. Emergence of *Coxiella burnetii* in ruminants on Reunion Island? Prevalence and risk factors. *PLoS Negl Trop Dis*, 8 (8):e3055.
- Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Sanghi PS, Lincoln P, Kunkel SL. 1996. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J Immunol*, 157 (10):4602-4608.
- Cianciotto NP, O'Connell W, Dasch GA, Mallavia LP. 1995. Detection of mip-like sequences and Mip-related proteins within the family Rickettsiaceae. *Curr Microbiol*, 30 (3):149-153.
- Coassin NA, Kline DL. 1957. Radiophosphorus measurement of the lifespan of lymphocytes in the rabbit. *Am J Physiol*, 190 (1):147-151.

Quellenverzeichnis

- Coleman SA, Fischer ER, Howe D, Mead DJ, Heinzen RA. 2004. Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *J Bacteriol*, 186 (21):7344-7352.
- Confer AW, Ayalew S. 2013. The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Vet Microbiol*, 163 (3-4):207-222.
- Courcoul A, Hogerwerf L, Klinkenberg D, Nielen M, Vergu E, Beaudeau F. 2011. Modelling effectiveness of herd level vaccination against Q fever in dairy cattle. *Vet Res*, 42:68.
- Davidson LB, Nessar R, Kempaiah P, Perkins DJ, Byrd TF. 2011. Mycobacterium abscessus glycopeptidolipid prevents respiratory epithelial TLR2 signaling as measured by HbetaD2 gene expression and IL-8 release. *PLoS One*, 6 (12):e29148.
- Dellacasagrande J, Capo C, Raoult D, Mege JL. 1999. IFN-gamma-mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *J Immunol*, 162 (4):2259-2265.
- Dellacasagrande J, Ghigo E, Raoult D, Capo C, Mege JL. 2002. IFN-gamma-induced apoptosis and microbicidal activity in monocytes harboring the intracellular bacterium *Coxiella burnetii* require membrane TNF and homotypic cell adherence. *J Immunol*, 169 (11):6309-6315.
- Dellacasagrande J, Ghigo E, Hammami SM, Toman R, Raoult D, Capo C, Mege JL. 2000. alpha(v)beta(3) integrin and bacterial lipopolysaccharide are involved in *Coxiella burnetii*-stimulated production of tumor necrosis factor by human monocytes. *Infect Immun*, 68 (10):5673-5678.
- Dinarello CA. 1997. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8 (4):253-265.
- Dinarello CA. 1998. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci*, 856:1-11.
- Dinarello CA. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118 (2):503-508.
- Dinarello CA. 2007. Mutations in cryopyrin: bypassing roadblocks in the caspase 1 inflammasome for interleukin-1beta secretion and disease activity. *Arthritis Rheum*, 56 (9):2817-2822.
- Dix A, Hunniger K, Weber M, Guthke R, Kurzai O, Linde J. 2015. Biomarker-based classification of bacterial and fungal whole-blood infections in a genome-wide expression study. *Front Microbiol*, 6:171.
- Dyer RE. 1949. Q fever; history and present status. *Am J Public Health Nations Health*, 39 (4):471-477.
- Eisenreich W, Heesemann J, Rudel T, Goebel W. 2013. Metabolic host responses to infection by intracellular bacterial pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*, 3:24.
- Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*, 229 (1):152-172.

Quellenverzeichnis

- Emikpe B, Yussouf SM, Ezeasor CK, Tanko PN. 2013. Immunohistochemical detection of *Brucella mellitensis* and *Coxiella burnetii* antigens in formalin-fixed tissues of West African Dwarf goats. *Archives of clinical microbiology* 4(4.2).
- Engstrom A, Erlandsson A, Delbro D, Wijkander J. 2014. Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2. *Int J Oncol*, 44 (2):385-392.
- Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. 2008. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*, 132 (1):9-14.
- Fahy RJ, Doseff AI, Wewers MD. 1999. Spontaneous human monocyte apoptosis utilizes a caspase-3-dependent pathway that is blocked by endotoxin and is independent of caspase-1. *J Immunol*, 163 (4):1755-1762.
- Feili-Hariri M, Falkner DH, Morel PA. 2005. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J Leukoc Biol*, 78 (3):656-664.
- Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, Liew FY. 1999. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania phosphoglycans* subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol*, 163 (12):6403-6412.
- Flannagan RS, Cosio G, Grinstein S. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol*, 7 (5):355-366.
- Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*, 7:61-98.
- Frangoulidis D, Splettstoesser WD, Landt O, Dehnhardt J, Henning K, Hilbert A, Bauer T, Antwerpen M, Meyer H, Walter MC, Knobloch JK. 2013. Microevolution of the chromosomal region of acute disease antigen A (*adaA*) in the query (Q) fever agent *Coxiella burnetii*. *PLoS One*, 8 (1):e53440.
- Gamaley IA, Klyubin IV. 1999. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int Rev Cytol*, 188:203-255.
- Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, Van Kooyk Y. 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*, 197 (1):7-17.
- Gessani S, Belardelli F. 1998. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev*, 9 (2):117-123.

Quellenverzeichnis

- Ghigo E, Capo C, Raoult D, Mege JL. 2001. Interleukin-10 stimulates *Coxiella burnetii* replication in human monocytes through tumor necrosis factor down-modulation: role in microbicidal defect of Q fever. *Infect Immun*, 69 (4):2345-2352.
- Ghigo E, Pretat L, Desnues B, Capo C, Raoult D, Mege JL. 2009. Intracellular life of *Coxiella burnetii* in macrophages. *Ann N Y Acad Sci*, 1166:55-66.
- Glasel JA. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, 18 (1):62-63.
- Glushakova O, Kosugi T, Roncal C, Mu W, Heinig M, Cirillo P, Sanchez-Lozada LG, Johnson RJ, Nakagawa T. 2008. Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 19 (9):1712-1720.
- Gordon S. 2007. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol*, 37 Suppl 1:S9-17.
- Gordon S. 2008. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *Eur J Immunol*, 38 (12):3257-3264.
- Gouwy M, Struyf S, Proost P, Van Damme J. 2005. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16 (6):561-580.
- Govender VS, Ramsugit S, Pillay M. 2014. Mycobacterium tuberculosis adhesins: potential biomarkers as anti-tuberculosis therapeutic and diagnostic targets. *Microbiology*, 160 (Pt 9):1821-1831.
- Graham JG, MacDonald LJ, Hussain SK, Sharma UM, Kurten RC, Voth DE. 2013. Virulent *Coxiella burnetii* pathotypes productively infect primary human alveolar macrophages. *Cell Microbiol*, 15 (6):1012-1025.
- Graves DT, Jiang Y. 1995. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med*, 6 (2):109-118.
- Guatteo R, Beaudeau F, Berri M, Rodolakis A, Joly A, Seegers H. 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet Res*, 37 (6):827-833.
- Gurtler L, Bauerfeind U, Blumel J, Burger R, Drosten C, Groner A, Heiden M, Hildebrandt M, Jansen B, Offergeld R, Pauli G, Seitz R, Schlenkrich U, Schottstedt V, Strobel J, Willkommen H. 2014. *Coxiella burnetii* - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. *Transfus Med Hemother*, 41 (1):60-72.
- Hackstadt T. 1986. Antigenic variation in the phase I lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii* isolates. *Infect Immun*, 52 (1):337-340.
- Hackstadt T. 1988. Steric hindrance of antibody binding to surface proteins of *Coxiella burnetii* by phase I lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 56 (4):802-807.

Quellenverzeichnis

- Hackstadt T. 1990. The role of lipopolysaccharides in the virulence of *Coxiella burnetii*. *Ann N Y Acad Sci*, 590:27-32.
- Hackstadt T, Peacock MG, Hitchcock PJ, Cole RL. 1985. Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnetii*: intrastrain heterogeneity in structure and antigenicity. *Infect Immun*, 48 (2):359-365.
- Hajishengallis G, Lambris JD. 2011. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 11 (3):187-200.
- Harris RJ, Storm PA, Lloyd A, Arens M, Marmion BP. 2000. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. *Epidemiol Infect*, 124 (3):543-549.
- Heinzen RA, Frazier ME, Mallavia LP. 1992. *Coxiella burnetii* superoxide dismutase gene: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 60 (9):3814-3823.
- Heinzen RA, Hackstadt T, Samuel JE. 1999. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol*, 7 (4):149-154.
- Hellenbrand W, Breuer T, Petersen L. 2001. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg Infect Dis*, 7 (5):789-796.
- Hendrix LR, Samuel JE, Mallavia LP. 1991. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *J Gen Microbiol*, 137 (2):269-276.
- Henning K, Sting R. 2002. Zur Sensitivität und Spezifität verschiedener Untersuchungsmethoden (Stamp-Färbung, Antigen-ELISA, PCR und Zellkultur) zum Nachweis des Zoonosenerregers *Coxiella burnetii*. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 115:381-384.
- Herrin B, Mahapatra S, Blouin EF, Shaw EI. 2011. Growth of *Coxiella burnetii* in the *Ixodes scapularis*-derived IDE8 tick cell line. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11 (7):917-922.
- Herzyk DJ, Allen JN, Marsh CB, Wewers MD. 1992. Macrophage and monocyte IL-1 beta regulation differs at multiple sites. Messenger RNA expression, translation, and post-translational processing. *J Immunol*, 149 (9):3052-3058.
- Heumann D, Roger T. 2002. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta*, 323 (1-2):59-72.
- Hilbert A, Andres T, Werner R, Wehr R, Fröhlich A, Conraths F, Henning K. 2015. Detection of *Coxiella burnetii* in dairy cattle bulk tank milk and single tank milk samples by confirmatory testing. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 128:271-277.
- Hirota K, Martin B, Veldhoen M. 2010. Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin Immunopathol*, 32 (1):3-16.

Quellenverzeichnis

- Hogerwerf L, van den Brom R, Roest HI, Bouma A, Vellema P, Pieterse M, Dercksen D, Nielen M. 2011. Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep, The Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 17 (3):379-386.
- Holt PG, Strickland DH, Wikstrom ME, Jahnsen FL. 2008. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*, 8 (2):142-152.
- Honstetter A, Ghigo E, Moynault A, Capo C, Toman R, Akira S, Takeuchi O, Lepidi H, Raoult D, Mege JL. 2004. Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through Toll-like receptor 4. *J Immunol*, 172 (6):3695-3703.
- Hoover TA, Culp DW, Vodkin MH, Williams JC, Thompson HA. 2002. Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the *Coxiella burnetii* nine mile strain. *Infect Immun*, 70 (12):6726-6733.
- Hotta A, Kawamura M, To H, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K. 2002. Phase variation analysis of *Coxiella burnetii* during serial passage in cell culture by use of monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 70 (8):4747-4749.
- Howe D, Barrows LF, Lindstrom NM, Heinzen RA. 2002. Nitric oxide inhibits *Coxiella burnetii* replication and parasitophorous vacuole maturation. *Infect Immun*, 70 (9):5140-5147.
- Howe D, Shannon JG, Winfree S, Dorward DW, Heinzen RA. 2010. *Coxiella burnetii* phase I and II variants replicate with similar kinetics in degradative phagolysosome-like compartments of human macrophages. *Infect Immun*, 78 (8):3465-3474.
- Hu S, Chao CC, Ehrlich LC, Sheng WS, Sutton RL, Rockswold GL, Peterson PK. 1999. Inhibition of microglial cell RANTES production by IL-10 and TGF-beta. *J Leukoc Biol*, 65 (6):815-821.
- Hussell T, Bell TJ. 2014. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*, 14 (2):81-93.
- Ishibashi Y, Claus S, Relman DA. 1994. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med*, 180 (4):1225-1233.
- Islam A, Lockhart M, Stenos J, Graves S. 2013. The attenuated nine mile phase II clone 4/RSA439 strain of *Coxiella burnetii* is highly virulent for severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Am J Trop Med Hyg*, 89 (4):800-803.
- Jager C, Lautenschlager S, Willems H, Baljer G. 2002. *Coxiella burnetii* plasmid types QpDG and QpH1 are closely related and likely identical. *Vet Microbiol*, 89 (2-3):161-166.
- Janagama HK, Jeong K, Kapur V, Coussens P, Sreevatsan S. 2006. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis strains. *BMC Microbiol*, 6:10.

Quellenverzeichnis

- Jimenez de Bagues MP, Terraza A, Gross A, Dornand J. 2004. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infect Immun*, 72 (4):2429-2433.
- Jiménez PH. 2012. Genetische Unterschiede zwischen *Coxiella burnetii*-Isolaten und ihre Korrelation zur Epidemiologie und Klinik des Q-Fiebers. VVB Laufersweiler Verlag.
- Jin Y, Lundkvist G, Dons L, Kristensson K, Rottenberg ME. 2004. Interferon-gamma mediates neuronal killing of intracellular bacteria. *Scand J Immunol*, 60 (5):437-448.
- Juhas M, Crook DW, Hood DW. 2008. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol*, 10 (12):2377-2386.
- Jungi TW, Thony M, Brcic M, Adler B, Pauli U, Peterhans E. 1996. Induction of nitric oxide synthase in bovine mononuclear phagocytes is differentiation stage-dependent. *Immunobiology*, 195 (3):385-400.
- Kersh GJ, Oliver LD, Self JS, Fitzpatrick KA, Massung RF. 2011. Virulence of pathogenic *Coxiella burnetii* strains after growth in the absence of host cells. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11 (11):1433-1438.
- Khavkin T, Tabibzadeh SS. 1988. Histologic, immunofluorescence, and electron microscopic study of infectious process in mouse lung after intranasal challenge with *Coxiella burnetii*. *Infect Immun*, 56 (7):1792-1799.
- Kidd P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*, 8 (3):223-246.
- Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B. 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol*, 6:2.
- Kleinnijenhuis J, Joosten LA, van de Veerdonk FL, Savage N, van Crevel R, Kullberg BJ, van der Ven A, Ottenhoff TH, Dinarello CA, van der Meer JW, Netea MG. 2009. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1beta production by *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*, 39 (7):1914-1922.
- Kocianova E, Kovacova EI, Literak I. 2001. Comparison of virulence of *Coxiella burnetii* isolates from bovine milk and from ticks. *Folia Parasitol (Praha)*, 48 (3):235-239.
- Koster FT, Williams JC, Goodwin JS. 1985a. Cellular immunity in Q fever: modulation of responsiveness by a suppressor T cell-monocyte circuit. *J Immunol*, 135 (2):1067-1072.
- Koster FT, Williams JC, Goodwin JS. 1985b. Cellular immunity in Q fever: specific lymphocyte unresponsiveness in Q fever endocarditis. *J Infect Dis*, 152 (6):1283-1289.

Quellenverzeichnis

- Kubes M, Kuzmova Z, Gajdosova E, Ihnatko R, Mucha V, Toman R, Kovacova E. 2006. Induction of tumor necrosis factor alpha in murine macrophages with various strains of *Coxiella burnetii* and their lipopolysaccharides. *Acta Virol*, 50 (2):93-99.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30 (1):16-34.
- Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, Riollot C. 2007. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine*, 38 (1):12-21.
- Langley JM. 1990. Perinatal Q fever: is *Coxiella burnetii* a human perinatal pathogen?
- Leutenegger CM, Alluwaimi AM, Smith WL, Perani L, Cullor JS. 2000. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol*, 77 (3-4):275-287.
- Lifshitz Z, Burstein D, Schwartz K, Shuman HA, Pupko T, Segal G. 2014. Identification of novel *Coxiella burnetii* Icm/Dot effectors and genetic analysis of their involvement in modulating a mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect Immun*, 82 (9):3740-3752.
- Lindstedt BA. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, 26 (13):2567-2582.
- Loos D. 2012. Untersuchungen zum Einfluss von Shigatoxin auf Makrophagen und Dendritische Zellen des Rindes.
- Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dzialo R, Trinchieri G. 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med*, 183 (1):147-157.
- Macellaro A, Tujulin E, Hjalmarsson K, Norlander L. 1998. Identification of a 71-kilodalton surface-associated Hsp70 homologue in *Coxiella burnetii*. *Infect Immun*, 66 (12):5882-5888.
- Mager M. 2013. Etablierung eines *in house*-ELISA zur Konzentrationsbestimmung von Interleukin-1-beta in *Coxiella burnetii* infizierten Rinder-Makrophagen
- Mallavia LP. 1991. Genetics of rickettsiae. *Eur J Epidemiol*, 7 (3):213-221.
- Marriott HM, Dockrell DH. 2007. The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp Lung Res*, 33 (10):493-505.
- Martin GS. 2012. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10 (6):701-706.
- Martinez E, Cantet F, Fava L, Norville I, Bonazzi M. 2014. Identification of OmpA, a *Coxiella burnetii* protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening. *PLoS Pathog*, 10 (3):e1004013.
- Maurin M, Raoult D. 1999. Q fever. *Clin Microbiol Rev*, 12 (4):518-553.

Quellenverzeichnis

- McCaughey C, Murray LJ, McKenna JP, Menzies FD, McCullough SJ, O'Neill HJ, Wyatt DE, Cardwell CR, Coyle PV. 2010. *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiol Infect*, 138 (1):21-27.
- McCaul TF, Williams JC. 1981. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol*, 147 (3):1063-1076.
- McDade JE. 1990. *Historical Aspects of Q Fever*. CRC Press.
- Meconi S, Jacomo V, Boquet P, Raoult D, Mege JL, Capo C. 1998. *Coxiella burnetii* induces reorganization of the actin cytoskeleton in human monocytes. *Infect Immun*, 66 (11):5527-5533.
- Meconi S, Capo C, Remacle-Bonnet M, Pommier G, Raoult D, Mege JL. 2001. Activation of protein tyrosine kinases by *Coxiella burnetii*: role in actin cytoskeleton reorganization and bacterial phagocytosis. *Infect Immun*, 69 (4):2520-2526.
- Meghari S, Honstetter A, Lepidi H, Ryffel B, Raoult D, Mege JL. 2005. TLR2 is necessary to inflammatory response in *Coxiella burnetii* infection. *Ann N Y Acad Sci*, 1063:161-166.
- Meghari S, Desnues B, Capo C, Grau GE, Raoult D, Mege JL. 2006. *Coxiella burnetii* stimulates production of RANTES and MCP-1 by mononuclear cells: modulation by adhesion to endothelial cells and its implication in Q fever. *Eur Cytokine Netw*, 17 (4):253-259.
- Meghari S, Bechah Y, Capo C, Lepidi H, Raoult D, Murray PJ, Mege JL. 2008. Persistent *Coxiella burnetii* infection in mice overexpressing IL-10: an efficient model for chronic Q fever pathogenesis. *PLoS Pathog*, 4 (2):e23.
- Melik-Parsadaniantz S, Rostene W. 2008. Chemokines and neuromodulation. *J Neuroimmunol*, 198 (1-2):62-68.
- Menge C, Loos D, Bridger PS, Barth S, Werling D, Baljer G. 2015. Bovine macrophages sense *Escherichia coli* Shiga toxin 1. *Innate Immun*.
- Mertens K, Lantsheer L, Samuel JE. 2005. A minimal set of DNA repair genes is sufficient for survival of *Coxiella burnetii* under oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*, 1063:73-75.
- Mertens K, Lantsheer L, Ennis DG, Samuel JE. 2008. Constitutive SOS expression and damage-inducible AddAB-mediated recombinational repair systems for *Coxiella burnetii* as potential adaptations for survival within macrophages. *Mol Microbiol*, 69 (6):1411-1426.
- Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, Hammerbeck CD, Popescu F, Xiao Z. 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev*, 211:81-92.

Quellenverzeichnis

- Miller JD, Curns AT, Thompson HA. 2004. A growth study of *Coxiella burnetii* Nine Mile Phase I and Phase II in fibroblasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 42 (3):291-297.
- Minnick MF, Raghavan R. 2012. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Adv Exp Med Biol*, 984:231-248.
- Mo YY, Cianciotto NP, Mallavia LP. 1995. Molecular cloning of a *Coxiella burnetii* gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue. *Microbiology*, 141 (Pt 11):2861-2871.
- Moos A, Hackstadt T. 1987. Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. *Infect Immun*, 55 (5):1144-1150.
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8 (12):958-969.
- Moussay E, Stamm I, Taubert A, Baljer G, Menge C. 2006. *Escherichia coli* Shiga toxin 1 enhances il-4 transcripts in bovine ileal intraepithelial lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, 113 (3-4):367-382.
- Murray PJ, Wynn TA. 2011a. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*, 89 (4):557-563.
- Murray PJ, Wynn TA. 2011b. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*, 11 (11):723-737.
- Naldini A, Leali D, Pucci A, Morena E, Carraro F, Nico B, Ribatti D, Presta M. 2006. Cutting edge: IL-1beta mediates the proangiogenic activity of osteopontin-activated human monocytes. *J Immunol*, 177 (7):4267-4270.
- Napolitani G, Bortoletto N, Racioppi L, Lanzavecchia A, D'Oro U. 2003. Activation of src-family tyrosine kinases by LPS regulates cytokine production in dendritic cells by controlling AP-1 formation. *Eur J Immunol*, 33 (10):2832-2841.
- Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O. 2008. Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science*, 321 (5891):964-967.
- Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA. 2009. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood*, 113 (10):2324-2335.
- Newton HJ, McDonough JA, Roy CR. 2013. Effector protein translocation by the *Coxiella burnetii* Dot/Icm type IV secretion system requires endocytic maturation of the pathogen-occupied vacuole. *PLoS One*, 8 (1):e54566.
- Omsland A, Heinzen RA. 2011. Life on the outside: the rescue of *Coxiella burnetii* from its host cell. *Annu Rev Microbiol*, 65:111-128.

Quellenverzeichnis

- Omsland A, Cockrell DC, Howe D, Fischer ER, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella SF, Heinzen RA. 2009. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (11):4430-4434.
- Opal SM, DePalo VA. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117 (4):1162-1172.
- Pape KA, Jenkins MK. 1998. A role for inflammatory cytokines in the productive activation of antigen-specific CD4+ T-cells. *Agents Actions Suppl*, 49:23-31.
- Parihar A, Eubank TD, Doseff AI. 2010. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *J Innate Immun*, 2 (3):204-215.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30 (9):e36.
- Pizarro-Cerda J, Cossart P. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124 (4):715-727.
- Pollard JW. 2009. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*, 9 (4):259-270.
- Prohl A, Ostermann C, Lohr M, Reinhold P. 2014. The bovine lung in biomedical research: visually guided bronchoscopy, intrabronchial inoculation and in vivo sampling techniques. *J Vis Exp*, (89).
- Qin H, Wilson CA, Lee SJ, Zhao X, Benveniste EN. 2005. LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. *Blood*, 106 (9):3114-3122.
- Raoult D, Marrie T, Mege J. 2005. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis*, 5 (4):219-226.
- Retzlaff C, Yamamoto Y, Okubo S, Hoffman PS, Friedman H, Klein TW. 1996. *Legionella pneumophila* heat-shock protein-induced increase of interleukin-1 beta mRNA involves protein kinase C signalling in macrophages. *Immunology*, 89 (2):281-288.
- Rodolakis A. 2009. Q Fever in dairy animals. *Ann N Y Acad Sci*, 1166:90-93.
- Rodolakis A, Berri M, Hechard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, Blanchard B, Camuset P, Devillechaise P, Natorp JC, Vadet JP, Arricau-Bouvery N. 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *J Dairy Sci*, 90 (12):5352-5360.
- Roest HI, Post J, van Gelderen B, van Zijderveld FG, Rebel JM. 2013. Q fever in pregnant goats: humoral and cellular immune responses. *Vet Res*, 44:67.
- Roest HJ, van Gelderen B, Dinkla A, Frangoulidis D, van Zijderveld F, Rebel J, van Keulen L. 2012. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS One*, 7 (11):e48949.

Quellenverzeichnis

- Romagnani S. 1991. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res*, 21 (2):152-158.
- Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MW, Shive HR, Weeks BR, Zhang GQ, Tersteeg C, Masegi T, Hotta A, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K, McMurray DN, Samuel JE. 2009. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infect Immun*, 77 (12):5640-5650.
- Sabatier F, Dignat-George F, Mege JL, Brunet C, Raoult D, Sampaol J. 1997. CD4+ T-cell lymphopenia in Q fever endocarditis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4 (1):89-92.
- Salthouse TN. 1984. Some aspects of macrophage behavior at the implant interface. *J Biomed Mater Res*, 18 (4):395-401.
- Samuel JE, Frazier ME, Mallavia LP. 1985. Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. *Infect Immun*, 49 (3):775-779.
- Savinelli EA, Mallavia LP. 1990. Comparison of *Coxiella burnetii* plasmids to homologous chromosomal sequences present in a plasmidless endocarditis-causing isolate. *Ann N Y Acad Sci*, 590:523-533.
- Schimmer B, Schotten N, van Engelen E, Hautvast JL, Schneeberger PM, van Duijnhoven YT. 2014. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk for humans on dairy cattle farms, the Netherlands, 2010-2011. *Emerg Infect Dis*, 20 (3):417-425.
- Schmitz GE, S.; Götte, D. 2008. Biomarker: Bedeutung für den medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung. Schattauer GmbH, Verlag für Medizin und Naturwissenschaften.
- Schneemann M, Schoeden G. 2007. Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. *J Leukoc Biol*, 81 (3):579; discussion 580.
- Schramek S, Mayer H. 1982. Different sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from phase I and pure phase II cells of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun*, 38 (1):53-57.
- Schramek S, Radziejewska-Lebrecht J, Mayer H. 1985. 3-C-branched aldoses in lipopolysaccharide of phase I *Coxiella burnetii* and their role as immunodominant factors. *Eur J Biochem*, 148 (3):455-461.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75 (2):163-189.
- Schwager I, Jungi TW. 1994. Effect of human recombinant cytokines on the induction of macrophage procoagulant activity. *Blood*, 83 (1):152-160.
- Sexton JA, Vogel JP. 2002. Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic*, 3 (3):178-185.
- Shannon JG, Heinzen RA. 2008. Infection of human monocyte-derived macrophages with *Coxiella burnetii*. *Methods Mol Biol*, 431:189-200.
- Shannon JG, Heinzen RA. 2009. Adaptive immunity to the obligate intracellular pathogen *Coxiella burnetii*. *Immunol Res*, 43 (1-3):138-148.

Quellenverzeichnis

- Shannon JG, Howe D, Heinzen RA. 2005a. Lack of dendritic cell maturation following infection by *Coxiella burnetii* synthesizing different lipopolysaccharide chemotypes. *Ann N Y Acad Sci*, 1063:154-160.
- Shannon JG, Howe D, Heinzen RA. 2005b. Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (24):8722-8727.
- Sharpe AH, Freeman GJ. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, 2 (2):116-126.
- Shen M, Horbett TA. 2001. The effects of surface chemistry and adsorbed proteins on monocyte/macrophage adhesion to chemically modified polystyrene surfaces. *J Biomed Mater Res*, 57 (3):336-345.
- Shi C, Pamer EG. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 11 (11):762-774.
- Slaba K, Hussein A, Palkovic P, Horvath V, Toman R. 2003. Studies on the immunological role of virenose and dihydrohydroxystreptose present in the *Coxiella burnetii* phase I lipopolysaccharide. *Ann N Y Acad Sci*, 990:505-509.
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 27:591-619.
- Sow FB, Gallup JM, Meyerholz DK, Ackermann MR. 2009. Gene profiling studies in the neonatal ovine lung show enhancing effects of VEGF on the immune response. *Dev Comp Immunol*, 33 (6):761-771.
- Spearman C, Kärber G. 1974. *Virologische Arbeitsmethoden*, Bd. 1. Gustav-Fischer-Verlag.
- Sprent J. 1993. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 5 (3):433-438.
- Stein A, Saunders NA, Taylor AG, Raoult D. 1993. Phylogenic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. *FEMS Microbiol Lett*, 113 (3):339-344.
- Stein A, Louveau C, Lepidi H, Ricci F, Baylac P, Davoust B, Raoult D. 2005. Q fever pneumonia: virulence of *Coxiella burnetii* pathovars in a murine model of aerosol infection. *Infect Immun*, 73 (4):2469-2477.
- Steinman RM, Banchereau J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449 (7161):419-426.
- Stoenner HG, Lackman DB. 1960. The biologic properties of *Coxiella burnetii* isolated from rodents collected in Utah. *Am J Hyg*, 71:45-51.
- Strimbu K, Tavel JA. 2010. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, 5 (6):463-466.
- Stuart LM, Ezekowitz RA. 2005. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*, 22 (5):539-550.

Quellenverzeichnis

- Sutton JS, Weiss L. 1966. Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epithelioid cells, and multinucleated giant cells. An electron microscope study. *J Cell Biol*, 28 (2):303-332.
- Svraka S, Toman R, Skultety L, Slaba K, Homan WL. 2006. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett*, 254 (2):268-274.
- Taraksoglou M, Szalabska U, Magee DA, Browne JA, Sweeney T, Gormley E, MacHugh DE. 2011. Transcriptional profiling of immune genes in bovine monocyte-derived macrophages exposed to bacterial antigens. *Vet Immunol Immunopathol*, 140 (1-2):130-139.
- Taubert A, Zahner H, Hermosilla C. 2006. Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. *Vet Parasitol*, 142 (3-4):214-222.
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 23:901-944.
- Thiele D, Willems H. 1994. Is plasmid based differentiation of *Coxiella burnetii* in 'acute' and 'chronic' isolates still valid? *Eur J Epidemiol*, 10 (4):427-434.
- Tigertt WD, Benenson AS, Gochenour WS. 1961. Airborne Q fever. *Bacteriol Rev*, 25:285-293.
- Tilburg JJ, Roest HJ, Buffet S, Nabuurs-Franssen MH, Horrevorts AM, Raoult D, Klaassen CH. 2012. Epidemic genotype of *Coxiella burnetii* among goats, sheep, and humans in the Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 18 (5):887-889.
- Tissot-Dupont H, Raoult D. 2008. Q fever. *Infect Dis Clin North Am*, 22 (3):505-514, ix.
- Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. 2004. Wind in November, Q fever in December. *Emerg Infect Dis*, 10 (7):1264-1269.
- To H, Htwe KK, Kako N, Kim HJ, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K. 1998. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J Vet Med Sci*, 60 (7):859-861.
- Tujulin E, Lilliehook B, Macellaro A, Sjostedt A, Norlander L. 1999. Early cytokine induction in mouse P388D1 macrophages infected by *Coxiella burnetii*. *Vet Immunol Immunopathol*, 68 (2-4):159-168.
- Turco J, Thompson HA, Winkler HH. 1984. Interferon-gamma inhibits growth of *Coxiella burnetii* in mouse fibroblasts. *Infect Immun*, 45 (3):781-783.
- Underhill DM, Ozinsky A. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*, 14 (1):103-110.
- Valkova D, Kazar J. 1995. A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. *FEMS Microbiol Lett*, 125 (2-3):275-280.

Quellenverzeichnis

- van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. 2011. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol*, 32 (3):110-116.
- van der Meer JW, van de Gevel JS, Blusse van Oud Alblas A, Kramps JA, van Zwet TL, Leijh PC, van Furth R. 1982. Characteristics of human monocytes cultured in the Teflon culture bag. *Immunology*, 47 (4):617-625.
- van Furth R, Cohn ZA. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, 128 (3):415-435.
- van Moll P, Baumgartner W, Eskens U, Hanichen T. 1993. Immunocytochemical demonstration of *Coxiella burnetii* antigen in the fetal placenta of naturally infected sheep and cattle. *J Comp Pathol*, 109 (3):295-301.
- van Schaik EJ, Samuel JE. 2012. Phylogenetic diversity, virulence and comparative genomics. *Adv Exp Med Biol*, 984:13-38.
- Varghees S, Kiss K, Frans G, Braha O, Samuel JE. 2002. Cloning and porin activity of the major outer membrane protein P1 from *Coxiella burnetii*. *Infect Immun*, 70 (12):6741-6750.
- Vishwanath S, Hackstadt T. 1988. Lipopolysaccharide phase variation determines the complement-mediated serum susceptibility of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun*, 56 (1):40-44.
- Vitiello L, Gorini S, Rosano G, la Sala A. 2012. Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood*, 120 (3):511-518.
- Vodkin MH, Williams JC. 1986. Overlapping deletion in two spontaneous phase variants of *Coxiella burnetii*. *J Gen Microbiol*, 132 (9):2587-2594.
- Vogel DY, Vereyken EJ, Glim JE, Heijnen PD, Moeton M, van der Valk P, Amor S, Teunissen CE, van Horssen J, Dijkstra CD. 2013. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J Neuroinflammation*, 10:35.
- Waag DM. 2007. *Coxiella burnetii*: host and bacterial responses to infection. *Vaccine*, 25 (42):7288-7295.
- Wang Y, Xiong X, Wu D, Wang X, Wen B. 2011. Efficient activation of T cells by human monocyte-derived dendritic cells (HMDCs) pulsed with *Coxiella burnetii* outer membrane protein Com1 but not by HspB-pulsed HMDCs. *BMC Immunol*, 12:52.
- Weber MM, Chen C, Rowin K, Mertens K, Galvan G, Zhi H, Dealing CM, Roman VA, Banga S, Tan Y, Luo ZQ, Samuel JE. 2013. Identification of *Coxiella burnetii* type IV secretion substrates required for intracellular replication and *Coxiella*-containing vacuole formation. *J Bacteriol*, 195 (17):3914-3924.

Quellenverzeichnis

- Weisburg WG, Dobson ME, Samuel JE, Dasch GA, Mallavia LP, Baca O, Mandelco L, Sechrest JE, Weiss E, Woese CR. 1989. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J Bacteriol*, 171 (8):4202-4206.
- West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, Prescott AR, Watts C. 2004. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*, 305 (5687):1153-1157.
- Wiebe ME, Burton PR, Shankel DM. 1972. Isolation and characterization of two cell types of *Coxiella burnetii* phase I. *J Bacteriol*, 110 (1):368-377.
- Wiley JS, Sluyter R, Gu BJ, Stokes L, Fuller SJ. 2011. The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens*, 78 (5):321-332.
- Willems H, Ritter M, Jager C, Thiele D. 1997. Plasmid-homologous sequences in the chromosome of plasmidless *Coxiella burnetii* Scurry Q217. *J Bacteriol*, 179 (10):3293-3297.
- Woldehiwet Z. 2004. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Res Vet Sci*, 77 (2):93-100.
- Yeruva L, Myers GS, Spencer N, Creasy HH, Adams NE, Maurelli AT, McChesney GR, Cleves MA, Ravel J, Bowlin A, Rank RG. 2014. Early microRNA expression profile as a prognostic biomarker for the development of pelvic inflammatory disease in a mouse model of chlamydial genital infection. *MBio*, 5 (3):e01241-01214.
- Yilmaz O, Yao L, Maeda K, Rose TM, Lewis EL, Duman M, Lamont RJ, Ojcius DM. 2008. ATP scavenging by the intracellular pathogen *Porphyromonas gingivalis* inhibits P2X7-mediated host-cell apoptosis. *Cell Microbiol*, 10 (4):863-875.
- Zaborina O, Li X, Cheng G, Kapatral V, Chakrabarty AM. 1999. Secretion of ATP-utilizing enzymes, nucleoside diphosphate kinase and ATPase, by *Mycobacterium bovis* BCG: sequestration of ATP from macrophage P2Z receptors? *Mol Microbiol*, 31 (5):1333-1343.
- Zamboni DS. <http://www.bv.fapesp.br/en/bolsas/129768/determination-of-the-cellular-mechanisms-involved-in-the-inhibition-of-the-activation-of-caspase-1-b/> (02.08.2015)
- Zamboni DS, McGrath S, Rabinovitch M, Roy CR. 2003. *Coxiella burnetii* express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol Microbiol*, 49 (4):965-976.
- Zamboni DS, Campos MA, Torrecilhas AC, Kiss K, Samuel JE, Golenbock DT, Lauw FN, Roy CR, Almeida IC, Gazzinelli RT. 2004. Stimulation of toll-like receptor 2 by *Coxiella burnetii* is required for macrophage production of pro-inflammatory cytokines and resistance to infection. *J Biol Chem*, 279 (52):54405-54415.

Quellenverzeichnis

- Zhang G, To H, Russell KE, Hendrix LR, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K, Samuel JE. 2005. Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane protein specific to isolates associated with acute disease. *Infect Immun*, 73 (3):1561-1567.
- Zhang GQ, To H, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K. 1997. Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (com1) encoding a 27-kDa outer membrane protein. *Microbiol Immunol*, 41 (11):871-877.
- Zhang JM, An J. 2007. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, 45 (2):27-37.
- Zhu J, Paul WE. 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res*, 20 (1):4-12.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 32 (12):e103.

Tabelle 21: LPS-bedingte Expression von Zytokin- und Chemokingenen in humanen (hu) sowie bovinen (bo) MDM und Alveolarmakrophagen.
Dargestellt sind \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen (Ergänzung zu Tabelle 11).

Zellen	Zeit	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	INF- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
hu MDM	3 h	\pm 493,3	\pm 194,6	\pm 2,6	\pm 2.7488,5	\pm 211,5	\pm 0,3	\pm 15,4	\pm 1,1	\pm 27,6	\pm 0,4
	1 d	\pm 2,8	\pm 6,9	\pm 0,9	\pm 17,7	\pm 1,6	\pm 0,2	\pm 0,7	\pm 1,9	\pm 9,1	\pm 0,2
bo MDM	3 h	\pm 165,7	\pm 11	\pm 2,5	\pm 147,6	\pm 48,1	\pm 0,3	\pm 6,8	\pm 10,5	\pm 11,6	\pm 9,7
	1 d	\pm 225,4	\pm 18,8	\pm 0,5	\pm 969,6	\pm 2,7	\pm 0,2	\pm 49,1	\pm 13,3	\pm 12,2	\pm 87,5
bo Alveolar- makrophagen	3 h	\pm 18,8	\pm 0,6	\pm 2,7	\pm 209,3	\pm 3,1	\pm 0,2	\pm 11,1	\pm 3,4	\pm 31,4	\pm 5,2
	1 d	\pm 558,2	\pm 14,7	\pm 0,3	\pm 164,5	\pm 4,4	\pm 0,04	\pm 51,6	\pm 34	\pm 13,5	\pm 52,5

Tabelle 22: Nm-Varianten-bedingte Zytokin- und Chemokin-Expression nach einer Infektion in bovinen MDM. Dargestellt sind \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen (Ergänzung zu Tabelle 15)

C. b.	Zeit	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	INF- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
NmI	3 h	\pm 1338,4	\pm 14,3	\pm 15,4	\pm 979,7	\pm 94	\pm 0,7	\pm 1,2	\pm 16,3	\pm 10,4	\pm 42,4
	1 d	\pm 17,5	\pm 1,6	\pm 0,8	\pm 29,9	\pm 2,2	\pm 0,1	\pm 0,3	\pm 0,9	\pm 8,7	\pm 6,1
	3 d	\pm 3,5	\pm 0,8	\pm 0,3	\pm 0,6	\pm 0,9	\pm 0,2	\pm 7,3	\pm 0,5	\pm 3,1	\pm 2,6
	7 d	\pm 0,9	\pm 0,3	\pm 0,1	\pm 0,7	\pm 0,3	\pm 0,1	\pm 1,5	\pm 0,5	\pm 0,8	\pm 1,4
NmII	3 h	\pm 2,8	\pm 0,4	\pm 0,6	\pm 2	\pm 1	\pm 0,2	\pm 1,2	\pm 0,3	\pm 0,3	\pm 0,4
	1 d	\pm 1,1	\pm 0,6	\pm 0,2	\pm 4,4	\pm 0,4	\pm 0,1	\pm 0,2	\pm 0,1	\pm 0,6	\pm 1,5
	3 d	\pm 0,5	\pm 0,5	\pm 0,1	\pm 0,4	\pm 0,2	\pm 0,1	\pm 0,5	\pm 0,1	\pm 0,2	\pm 1,0
	7 d	\pm 0,9	\pm 0,5	\pm 0,1	\pm 0,9	\pm 0,3	\pm 0,1	\pm 1,7	\pm 0,5	\pm 0,6	\pm 1,8
NmI_HI	3 h	\pm 778,1	\pm 9,9	\pm 8,5	\pm 529,4	\pm 47,2	\pm 0,5	\pm 0,8	\pm 9,3	\pm 9,5	\pm 23,1
	1 d	\pm 31,9	\pm 1,5	\pm 0,6	\pm 34,6	\pm 3	\pm 0,2	\pm 0,4	\pm 2,5	\pm 8,4	\pm 4,9
	3 d	\pm 1,2	\pm 0,5	\pm 0,2	\pm 0,8	\pm 0,6	\pm 0,2	\pm 4,8	\pm 0,4	\pm 2,4	\pm 1,7
	7 d	\pm 0,9	\pm 0,3	\pm 0,2	\pm 0,8	\pm 0,4	\pm 0,1	\pm 0,4	\pm 0,2	\pm 0,6	\pm 1,5

Tabelle 23: C. b-spezifische Zytokin- und Chemokin-Expression nach einer Infektion in bovinen MDM. Dargestellt sind \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen (Ergänzung zu Tabelle 16).

C. b.	Zeit	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	INF- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
H	3 h	\pm 1.017,2	\pm 12,1	\pm 9,5	\pm 681,2	\pm 106,0	\pm 1,0	\pm 1,0	\pm 12,1	\pm 11,7	\pm 40,3
	1 d	\pm 21,9	\pm 3,2	\pm 0,5	\pm 23,4	\pm 2,4	\pm 0,1	\pm 0,2	\pm 2,5	\pm 10,4	\pm 4,8
	3 d	\pm 1,2	\pm 0,4	\pm 0,2	\pm 0,4	\pm 0,3	\pm 0,1	\pm 5,4	\pm 0,2	\pm 1,3	\pm 4,4
S	3 h	\pm 40,6	\pm 1,0	\pm 1,1	\pm 17,8	\pm 8,4	\pm 0,2	\pm 0,8	\pm 1,4	\pm 0,7	\pm 1,5
	1 d	\pm 2,1	\pm 1,4	\pm 0,5	\pm 4,1	\pm 0,6	\pm 0,1	\pm 0,8	\pm 0,4	\pm 2,4	\pm 1,0
	3 d	\pm 0,8	\pm 0,3	\pm 0,1	\pm 0,2	\pm 0,4	\pm 0,1	\pm 10,2	\pm 0,3	\pm 0,8	\pm 0,4
D	3 h	\pm 1.115,9	\pm 9,6	\pm 8,9	\pm 1.082,2	\pm 91,0	\pm 0,9	\pm 1,0	\pm 11,0	\pm 8,6	\pm 33,4
	1 d	\pm 16,0	\pm 2,3	\pm 0,7	\pm 11,9	\pm 2,0	\pm 0,2	\pm 0,3	\pm 1,4	\pm 9,3	\pm 4,0
	3 d	\pm 0,5	\pm 0,3	\pm 0,3	\pm 0,2	\pm 0,4	\pm 0,3	\pm 1,0	\pm 0,1	\pm 0,6	\pm 0,2
Z3055/91	3 h	\pm 48,6	\pm 1,2	\pm 2,9	\pm 7,9	\pm 3,7	\pm 0,2	\pm 0,2	\pm 3,0	\pm 1,1	\pm 1,7
	1 d	\pm 5,0	\pm 1,7	\pm 1,8	\pm 2,9	\pm 1,1	\pm 0,4	\pm 3,1	\pm 1,1	\pm 3,7	\pm 1,4
	3 d	\pm 0,3	\pm 0,1	\pm 0,2	\pm 0,2	\pm 0,2	\pm 0,2	\pm 3,6	\pm 0,3	\pm 0,5	\pm 0,3
Z69/06	3 h	\pm 42,4	\pm 1,3	\pm 2,9	\pm 16,5	\pm 5,8	\pm 0,2	\pm 0,2	\pm 2,5	\pm 1,2	\pm 2,2
	1 d	\pm 22,8	\pm 1,1	\pm 0,8	\pm 11,0	\pm 3,0	\pm 0,1	\pm 19,4	\pm 0,3	\pm 3,7	\pm 7,5
	3 d	\pm 1,0	\pm 0,5	\pm 0,3	\pm 0,3	\pm 0,6	\pm 0,2	\pm 2,5	\pm 0,3	\pm 1,2	\pm 1,8

Tabelle 24: C. b-spezifische Zytokin- und Chemokin-Expression nach einer Infektion in bovinen MDM. Dargestellt sind \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen (Ergänzung zu Tabelle 17).

C. b.	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	INF- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
Nml	\pm 1338,4	\pm 14,3	\pm 15,4	\pm 979,7	\pm 94,0	\pm 0,7	\pm 1,2	\pm 16,3	\pm 10,4	\pm 42,4
Nmli	\pm 2,8	\pm 0,4	\pm 0,6	\pm 2,0	\pm 1,0	\pm 0,2	\pm 1,2	\pm 0,3	\pm 0,3	\pm 0,4
H	\pm 1017,2	\pm 12,1	\pm 9,5	\pm 681,2	\pm 106,0	\pm 1,0	\pm 1,0	\pm 12,1	\pm 11,7	\pm 40,3
S	\pm 40,6	\pm 1,0	\pm 1,1	\pm 17,8	\pm 8,4	\pm 0,2	\pm 0,8	\pm 1,4	\pm 0,7	\pm 1,5
D	\pm 1115,9	\pm 9,6	\pm 8,9	\pm 1.082,2	\pm 91,0	\pm 0,9	\pm 1,0	\pm 11,0	\pm 8,6	\pm 33,4
Z3055/91	\pm 48,6	\pm 1,2	\pm 2,9	\pm 7,9	\pm 3,7	\pm 0,2	\pm 0,2	\pm 3,0	\pm 1,1	\pm 1,7
Z69/06	\pm 42,4	\pm 1,3	\pm 2,9	\pm 16,5	\pm 5,8	\pm 0,2	\pm 0,2	\pm 2,5	\pm 1,2	\pm 2,2
Cb 23/2	\pm 1,5	\pm 0,6	\pm 0,4	\pm 1,0	\pm 0,7	\pm 0,2	\pm 0,6	\pm 0,2	\pm 0,3	\pm 0,4
Cb 71/3	\pm 1,5	\pm 0,7	\pm 0,4	\pm 1,0	\pm 1,1	\pm 0,2	\pm 0,9	\pm 0,3	\pm 0,3	\pm 0,5
Cb 98/2	\pm 4,7	\pm 0,7	\pm 0,5	\pm 2,4	\pm 1,7	\pm 0,2	\pm 0,7	\pm 0,3	\pm 0,3	\pm 0,5
Cb 19/34	\pm 1,1	\pm 0,4	\pm 0,3	\pm 0,6	\pm 0,5	\pm 0,2	\pm 0,6	\pm 0,3	\pm 0,3	\pm 0,4
Cb 30/14	\pm 1,9	\pm 0,7	\pm 0,5	\pm 0,5	\pm 1,0	\pm 0,2	\pm 2,1	\pm 0,3	\pm 0,5	\pm 0,7
Z3464/92	\pm 1,9	\pm 0,5	\pm 0,5	\pm 1,2	\pm 0,8	\pm 0,3	\pm 1,6	\pm 0,3	\pm 0,3	\pm 0,5
Nml_HI	\pm 778,1	\pm 9,9	\pm 8,5	\pm 529,4	\pm 47,2	\pm 0,5	\pm 0,8	\pm 9,3	\pm 9,5	\pm 23,1

Tabelle 25: C. b.-spezifische Zytokin- und Chemokin-Expression nach einer Infektion in humanen MDM. Dargestellt sind \pm SD aus 3 verschiedenen Versuchen (Ergänzung zu Tabelle 19).

C. b.	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	INF- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
Nml	\pm 3,1	\pm 6,6	\pm 0,5	\pm 36,1	\pm 3,3	\pm 0,5	\pm 0,6	\pm 20,7	\pm 1,0	\pm 1,2
NmlI	\pm 2,0	\pm 2,3	\pm 0,4	\pm 42,8	\pm 1,9	\pm 0,4	\pm 2,6	\pm 8,4	\pm 1,9	\pm 0,9
H	\pm 17,2	\pm 21,3	\pm 1,3	\pm 1.459,3	\pm 9,1	\pm 0,4	\pm 0,5	\pm 6,4	\pm 2,0	\pm 2,5
S	\pm 3,3	\pm 4,6	\pm 0,4	\pm 69,1	\pm 2,4	\pm 0,5	\pm 3,4	\pm 6,1	\pm 0,9	\pm 1,3
D	\pm 9,6	\pm 9,9	\pm 0,5	\pm 249,8	\pm 4,8	\pm 0,3	\pm 0,3	\pm 12,3	\pm 1,5	\pm 1,7
Z3055/91	\pm 4,6	\pm 4,1	\pm 0,3	\pm 33,5	\pm 1,2	\pm 0,4	\pm 0,2	\pm 9,0	\pm 1,0	\pm 1,4
Z69/06	\pm 10,5	\pm 9,8	\pm 0,7	\pm 191,4	\pm 3,5	\pm 0,4	\pm 0,2	\pm 10,3	\pm 1,1	\pm 2,7
Cb 23/2	\pm 0,7	\pm 3,4	\pm 0,1	\pm 38,6	\pm 0,8	\pm 0,2	\pm 7,7	\pm 3,1	\pm 0,6	\pm 1,2
Cb 71/3	\pm 1,3	\pm 4,3	\pm 0,4	\pm 44,9	\pm 1,6	\pm 0,2	\pm 3,4	\pm 11,3	\pm 0,4	\pm 1,6
Cb 98/2	\pm 1,3	\pm 2,7	\pm 0,1	\pm 78,9	\pm 1,8	\pm 0,2	\pm 3,1	\pm 16,9	\pm 0,4	\pm 0,04
Cb 19/34	\pm 0,6	\pm 2,4	\pm 0,4	\pm 14,2	\pm 1,4	\pm 0,1	\pm 1,7	\pm 52,3	\pm 0,1	\pm 0,1
Cb 30/14	\pm 0,6	\pm 1,7	\pm 0,2	\pm 38,0	\pm 1,1	\pm 0,3	\pm 2,8	\pm 4,1	\pm 0,4	\pm 1,3
Z3464/92	\pm 2,2	\pm 1,7	\pm 0,3	\pm 35,8	\pm 0,5	\pm 0,4	\pm 5,7	\pm 4,0	\pm 0,9	\pm 1,9
Nml_HI	\pm 6,2	\pm 7,2	\pm 0,3	\pm 174,2	\pm 2,3	\pm 0,4	\pm 9,6	\pm 5,1	\pm 0,7	\pm 1,9

Tabelle 26: C. b.-induzierte Zytokin- und Chemokin-Expression in bovinen Alveolarmakrophagen. Dargestellt sind \pm SD aus 3 verschiedenen Versuchen (Ergänzung zu Tabelle 20).

C. b.	IL-1 β	IL-8	IL-10	IL-12	TNF- α	TGF- β	INF- γ	MCP-1	RANTES	iNOS
Nml	\pm 3,1	\pm 0,4	\pm 0,2	\pm 3,3	\pm 1,1	\pm 0,2	\pm 0,1	\pm 0,5	\pm 0,7	\pm 0,6
NmlI	\pm 9,0	\pm 0,7	\pm 0,3	\pm 2,4	\pm 0,7	\pm 0,2	\pm 0,3	\pm 0,7	\pm 0,7	\pm 0,5
H	\pm 7,8	\pm 0,2	\pm 0,3	\pm 169,6	\pm 1,9	\pm 0,2	\pm 0,3	\pm 0,1	\pm 2,1	\pm 11,8
Nml_HI	\pm 11,3	\pm 0,6	\pm 0,3	\pm 15,4	\pm 1,7	\pm 0,2	\pm 0,2	\pm 0,6	\pm 1,1	\pm 1,2

Anhang

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut Jena angefertigt und ich danke dem Institutsleiter und meinem Betreuer Prof. Dr. Christian Menge für die Bereitstellung des Themas, sein Vertrauen sowie die stetige Diskussionsbereitschaft zu aufgetretenen theoretischen und praktischen Problemen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Andreas Henke für die Betreuung als Doktorvater und für die Anfertigung des Erstgutachten. Seine immerwährende Unterstützung bei Problemen mit der Auswertung und Interpretation von Daten sowie die motivierende Begleitung seit dem Studium haben entscheidend an dem Gelingen dieser Arbeit und an meiner wissenschaftlichen Entwicklung beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Katharina Kerner bedanken, die mich zu Beginn der Doktorarbeit im Labor tatkräftig unterstützt und mich in die durchflusszytometrische Analyse von Zellen eingearbeitet hat. Dr. Carsten Heydel danke ich für die konstruktive Diskussionsbereitschaft bei theoretischen Fragen, für die Durchführung und Bereitstellung der Daten für die Charakterisierung der *C. b.*-Stämme sowie die Bestimmung der Lebendkeimzahlen. Für die Bearbeitung der Proben möchte ich mich besonders herzlich bei den technischen Assistentinnen Betina Hopf, Anja Müller und Anke Hinsching bedanken, ohne ihre Unterstützung wäre die Arbeit nicht möglich gewesen. Zudem danke ich Annette Prohl und Kirstin Hillarius für die Gewinnung und Bereitstellung der BALF sowie der humanen MDM.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Arbeitsgruppe für die vielen schönen Tage im Labor und ihrer uneingeschränkten Hilfsbereitschaft: danke an Marvin Mager, Katharina Bonkowski, Sarah Stalb, Nadine Schmidt, Katharina Hamm und Stephanie Barth. Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei Steffi Wilsky für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinem Lebensgefährten und meinen Freunden, die mich während dieser Zeit immer unterstützt und ermutigt haben mein Ziel zu erreichen.

Anhang

Lebenslauf

28.09.1986	geboren in Gera
Sep. 93 - Juli 97	Grundschule Gera
Aug. 97 - Juli 99	Realschule Gera
Sep. 99 - Mai 05	Karl-Theodor-Liebe-Gymnasium Gera
Okt. 05 – Sep. 07	Friedrich-Schiller-Universität Jena Grundstudium Biologie
Okt. 07 - Juli 09	Friedrich-Schiller-Universität Jena Hauptstudium Biologie
Aug. 09 - Okt. 10	Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Jena Diplomarbeit: „Charakterisierung der NFκB-induzierten Signaltransduktion in Coxsackievirus B3-infizierten B-Zellen“
Feb. 11 – Okt. 15	Friedrich-Loeffler-Institut, Jena

Jena, den 22. Mai 2016

Katharina Sobotta

Veröffentlichungen der Ergebnisse

Tagungen

Sobotta, Katharina, C. Heydel, K. Kerner, G. Baljer und Ch. Menge

Replication of different *Coxiella burnetii* strains in bovine macrophages and induced host cell responses; Posterpräsentation, Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ der DVG, 27.06.-29.06.12, Leipzig

Sobotta, Katharina, C. Heydel, K. Kerner, G. Baljer und Ch. Menge

Replication of different *Coxiella burnetii* strains in macrophages of ruminants and induced host cell responses; Posterpräsentation, 4th European Veterinary Immunology Workshop, 02.09.-04.09.12, Edinburgh

Sobotta, Katharina, C. Heydel, K. Kerner, G. Baljer und Ch. Menge

Replication of different *Coxiella burnetii* strains in bovine macrophages and induced host cell responses; Posterpräsentation, 2. Infektionsmedizinisches Symposium Mitteldeutschland -Nachwuchs forscht-, 10.09.12, Leipzig

Anhang

Sobotta, Katharina, C. Heydel, K. Kerner, G. Baljer und Ch. Menge

Replication of different *Coxiella burnetii* strains in macrophages of ruminants and induced host cell responses; Posterpräsentation, 64. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 30.09.-03.10.12, Hamburg

Sobotta, Katharina, C. Heydel, K. Kerner, G. Baljer und Ch. Menge

Replication of different *Coxiella burnetii* (*C. b.*) strains in macrophages of ruminants and induced host cell responses, Posterpräsentation, Nationales Symposium für Zoonoseforschung, 11.10.-12.10.12, Berlin

Sobotta, Katharina; C. Heydel; K. Kerner; G. Baljer und Ch. Menge

Replication of different *Coxiella burnetii* strains in bovine macrophages and induced host cell response; Posterpräsentation, Annual Meeting des Veterinärimmunologischen Arbeitskreises der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 05.04.-06.04.13, Wien

Sobotta, Katharina und Ch. Menge

Evaluation of biomarkers to predict the zoonotic potential of *Coxiella burnetii* strains from different hosts; Vortrag, Annual Meeting „Veterinärmedizinischer Arbeitskreis“ der DGfI, 2.5.-3.5.14, Jena

Sobotta, Katharina; C. Heydel; K. Kerner; C. Ewers; G. Baljer und Ch. Menge

Identification of potential biomarkers for the virulence of *Coxiella burnetii* strains; Posterpräsentation, Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ der DVG, 26.5.-28.5.14, Freising

Sobotta, Katharina; C. Heydel; K. Hillarius; C. Ewers; G. Baljer und Ch. Menge

Identification of potential biomarkers for the virulence of *Coxiella burnetii* strains; Posterpräsentation, Nationales Symposium für Zoonoseforschung, 16.10.-17.10.14, Berlin

Publikationen und Abschlussarbeiten

Mager, Marvin (Betreuer und Gutachter: Katharina Sobotta)

Etablierung eines *in house*-ELISA zur Konzentrationsbestimmung von Interleukin-1-beta in *Coxiella burnetii* infizierten Rinder-Makrophagen; Bachelorarbeit, FH-Jena, 2013

Sobotta, Katharina; K. Hillarius; M. Mager; K. Kerner; C. Heydel und Ch. Menge

Coxiella burnetii productively infects primary bovine macrophages but limits the host cell response; Infection and Immunity, eingereicht August 2015

Sobotta, Katharina; K. Hillarius, K. Kerner, C. Heydel und Ch. Menge

Identification of potential biomarkers for the virulence of *Coxiella burnetii* strains; in Vorbereitung

Anhang

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Christian Menge, Prof. Dr. Andreas Henke und Dr. Carsten Heydel,

dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 22. Mai 2016

Katharina Sobotta