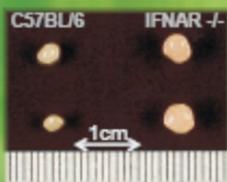
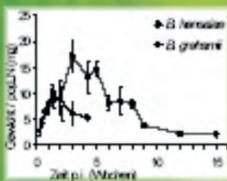


ETABLIERUNG UND IMMUNOLOGISCHE ANALYSE EINES MAUSMODELLS DER DURCH *BARTONELLA HENSELAE* AUSGELÖSTEN KATZENKRATZKRANKHEIT DES MENSCHEN



STEFANIE ANGELA KUNZ

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

und

dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
des Universitätsklinikums Freiburg i.B.
Betreuer: PD Dr. A. Sander und Prof. Dr. C. Bogdan

**Etablierung und immunologische Analyse eines Mausmodells
der durch *Bartonella henselae* ausgelösten
Katzenkratzkrankheit des Menschen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Stefanie Angela Kunz
Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
Prof. Dr. C. Bogdan
Prof. Dr. A. Moritz

Tag der Disputation: 06. November 2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	8
1 Einleitung.....	10
2 Literatur	11
2.1 Das Genus <i>Bartonella</i>	11
2.2 <i>Bartonella quintana</i>	13
2.3 <i>Bartonella grahamii</i>	14
2.4 <i>Bartonella henselae</i>	14
2.4.1 Allgemeines	14
2.4.2 Epidemiologie.....	15
2.4.3 Infektionen der Katze mit <i>B. henselae</i>	16
2.4.4 Infektionen des Menschen mit <i>B. henselae</i> :	
Vasoproliferative Veränderungen und Katzenkratzkrankheit	16
2.4.5 Virulenzfaktoren von <i>B. henselae</i>	19
2.4.6 Pathogenese der Katzenkratzkrankheit.....	20
2.5 Fragestellung der Dissertationsarbeit.....	23
3 Material und Methoden.....	27
3.1 Materialien	27
3.1.1 Nährmedien, Lösungen und Puffer.....	27
3.1.2 Bakterien.....	27
3.1.3 Mäuse.....	28
3.2 Methoden	29
3.2.1 Kultivierung der Bartonellen	29
3.2.2 Ernten der Bartonellen	30
3.2.3 Inaktivierung der Bartonellen	30
3.2.4 Aufreinigung der Membranproteine von Bartonellen	30
3.2.5 Aufreinigung der genomischen DNA von Bartonellen	31
3.2.6 Charakterisierung der <i>B. henselae</i> -Primärisolate	32
3.2.6.1 Koloniemorphologie	32
3.2.6.2 Bestimmung des Genotyps, DNA- <i>Fingerprint</i> -Techniken und Nachweis des virB4-Gens	33
Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	33
Auftrennung und Detektion der PCR-Produkte	33
Amplifikation Bartonellen-spezifischer DNA	34

Bestimmung des Genotyps.....	34
<i>Arbitrarily Primed</i> -PCR (AP-PCR) mit M13 Primer	35
<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i> -PCR (ERIC-PCR)	35
<i>Repetitive Extragenic Palindromic</i> -PCR (REP-PCR).....	36
Nachweis von virB4 ¹⁴⁶⁻²⁵⁶ , virB4 ²³⁷⁻³⁵⁷ und virB4 ⁴⁸⁰⁻⁵³⁷	37
3.2.6.3. Western-Immunoblot zum Nachweis von Bartonella Adhesin A (BadA).....	38
3.2.7 Durchführung der Mausinfektionsversuche	40
3.2.7.1 Inokulation der Bartonellen	40
3.2.7.2 Sektion der Mäuse und Probennahme.....	40
3.2.7.3 Anlegen und Auswerten von Kulturen aus Mausgewebeproben	41
3.2.7.4 Bestimmung der Zellzahl je Lymphknoten.....	41
3.2.7.5 Nachweis Bartonellen-spezifischer DNA aus Mausgewebe.....	42
3.2.7.6 Nachweis Bartonellen-spezifischer Antikörper (IgG) im Serum.....	43
Immunfluoreszenztest	43
Western-Immunoblot	44
3.2.8 Anfertigung von Gefrierschnitten und Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	45
3.2.9 Durchflusszytometrie.....	45
3.2.10 Untersuchung der Zellproliferation <i>in vivo</i>	47
3.2.11 Untersuchung der Migration von Zellen <i>in vivo</i>	48
3.2.12 Generierung von dendritischen Zellen und Makrophagen aus Knochenmark der Maus	49
3.2.12.1 Gewinnung von Knochenmark aus Mäusen	49
3.2.12.2 Generierung von myeloiden dendritischen Zellen (mDC).....	49
3.2.12.3 Generierung von Knochenmarksmakrophagen (BM-MΦ).....	50
3.2.12.4 Generierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC).....	50
3.2.13 Kultivierung und Stimulation von mDC, BM-MΦ und pDC.....	51
3.2.14 Nitritbestimmung über Griess-Reaktion.....	52
3.2.15 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) zur Bestimmung von Zytokinen ..	53
3.2.16 Nachweis von Typ I Interferon.....	54
3.2.16.1 Quantitative Bestimmung der Interferon- α/β -mRNA Expression	54
3.2.16.2 Nachweis von Interferon- α/β -Protein durch VSV-Bioassay	56
4 Ergebnisse.....	58
4.1 Charakterisierung der verwendeten <i>B. henselae</i> -Primärisolate	58
4.1.1 Beurteilung der Kolonimorphologie	58

4.1.2	Zuordnung zu Genotyp I bzw. II	59
4.1.3	Unterscheidung der einzelnen Primärisolate mittels DNA- <i>fingerprint</i> -Techniken.	60
4.1.4	Nachweis des virB4-Gens.....	61
4.1.5	Nachweis des äußeren Membranproteins BadA.....	62
4.1.6	Auswahl der im weiteren verwendeten <i>B. henselae</i> -Primärisolate sowie Zusammenfassung der Eigenschaften dieser Stämme	63
4.2	Etablierung eines Mausmodells zur humanen Katzenkratzkrankheit (KKK).....	65
4.2.1	Infektionsverlauf nach subkutaner Applikation von <i>B. henselae</i> , <i>B. grahamii</i> bzw. <i>B. quintana</i>	65
4.2.1.1	Allgemeinbefinden und Krankheitssymptome infizierter Tiere	65
4.2.1.2	Veränderungen des drainierenden Lymphknotens.....	66
	Gewicht und Zellzahl	66
	Histologie	67
	Zellkomposition	67
4.2.1.3	Nachweis <i>B. henselae</i> -spezifischer Antikörper im Serum infizierter Mäuse	71
4.2.1.4	Nachweis von Bartonellen in infizierten Mäusen.....	71
	Anzucht von <i>B. henselae</i> Fr98/K8 bzw. K8aM	72
	DNA-Nachweis nach Infektion mit <i>B. henselae</i> Fr98/K8 bzw. K8aM.....	72
	Anzucht von <i>B. grahamii</i> ATCC 700132 bzw. <i>B. quintana</i> CIP 103739	73
	DNA-Nachweis nach Infektion mit <i>B. grahamii</i> ATCC 700132 bzw. <i>B.</i> <i>quintana</i> CIP 103739	73
4.2.2	Elimination von <i>B. henselae</i> in immundefizienten Mausstämmen	75
4.2.3	Veränderungen des drainierenden Lymphknotens nach Injektion inaktivierter <i>B.</i> <i>henselae</i>	78
4.2.4	Einfluß von <i>B. henselae</i> -Genotyp oder -Isolat auf die Entwicklung der Lymphadenopathie	80
4.3	Untersuchung der der Lymphadenopathie von Mäusen nach Infektion mit Bartonellen zugrunde liegenden Vorgänge.....	82
4.3.1	Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen <i>in vitro</i>	82
4.3.2	Proliferation und Migration von Zellen nach Infektion mit Bartonellen.....	85
4.3.2.1	Proliferation von Zellen <i>in vivo</i>	86
4.3.2.2	Einwanderung von Zellen in drainierende Lymphknoten.....	88
4.3.3	Rolle von Typ I Interferonen bei Infektion mit Bartonellen.....	89

4.3.3.1	Expression von Typ I Interferonen durch pDC <i>in vitro</i> nach Stimulation mit lebenden und inaktivierten Bartonellen sowie mit Bartonellen-DNA und -Membranproteinen	90
4.3.3.2	Expression von Typ I Interferonen durch MyD88 ^{-/-} , TRIF ^{-/-} , TLR9 ^{-/-} und TLR4 ^{-/-} pDCs nach Stimulation mit Bartonellen <i>in vitro</i>	95
4.3.3.3	Einfluß von Typ I Interferonen <i>in vivo</i>	99
5	Diskussion.....	101
5.1	Etablierung eines Mausmodells der humanen KKK.....	102
5.1.1.	Bartonellen-Isolate, Bartonellen-Spezies und Krankheitsverlauf.....	102
5.1.2	Mechanismen der Erregerkontrolle	104
5.2	Charakteristika und Immunpathogenese der Lymphadenopathie nach <i>Bartonella</i> Infektion	106
5.2.1	Lebende versus tote Erreger	106
5.2.2	Histologische Charakteristika der Lymphadenopathie	106
5.2.3	Mögliche Mechanismen, die zur Lymphadenopathie von Mäusen nach Infektion mit Bartonellen beitragen	107
5.2.3.1	Stimulation von Immunzellen: Freisetzung von Effektormolekülen und Zytokinen	107
5.2.3.2	Immigration und Proliferation von Zellen	108
5.2.3.3	Aufrechterhaltung der Immunreaktion.....	110
5.2.3.4	Typ I Interferone und ihre Funktion bei der Entstehung der Lymphadenopathie ..	111
6	Zusammenfassung	116
	Summary.....	118
7	Literaturverzeichnis	120
	Anhang	141
	Danksagung.....	144

Abkürzungen

-	keine Expression	DNA	Desoxyribonukleinsäure
+	vorhandene Expression	<i>E. coli</i>	Escherichia coli
°C	Grad Celsius	EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat-Natriumsalz
A	Ampere	ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
AP-PCR	<i>Arbitrarily Primed-PCR</i>	ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR</i>
APC	Allophycocyanin	evtl.	eventuell
Aq. ad inj.	Aqua ad injectabilia	Fa.	Firma
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
<i>B. grah.</i>	<i>Bartonella grahamii</i>	FAM	Carboxyfluoreszein
<i>B. hens.</i>	<i>Bartonella henselae</i>	FCS	Foetales Kälberserum
BA	Bazilläre Angiomatose	FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
BadA	<i>Bartonella Adhesin A</i>	Flt-3 Ligand	<i>fms-like Tyrosine Kinase-3 Ligand</i>
Bep	<i>Bartonella Translocated Effector Protein</i>	GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor
BM-MΦ	aus Knochenmarkszellen generierte Makrophagen	GU	Guanosin Uridin
bp	Basenpaar(e)	h	Stunde(n)
BP	Bazilläre Peliosis	HCB-Agar	Hefe-Cystein-Blut-Agar
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin	HIV	Humanes Immundefizienz Virus
BSA	Bovines Serumalbumin	HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
bzw.	beziehungsweise	i.p.	intraperitoneal
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin	i.v.	intravenös
ca.	circa	ialB	<i>Invasion-associated Locus B</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	IFN	Interferon
cDNA	komplementäre DNA	IFNAR	Interferon- α/β -Rezeptor
CFDA-SE	5-(und-6)-Carboxyfluoreszeindiacetat-succinimidylester	IFT	Immunfluoreszenztest
CFSE	5-(und-6)-Carboxyfluoreszeinsuccinimidylester	Ig	Immunglobulin
CIP	<i>Collection de l'Institut Pasteur</i>	IL	Interleukin
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid	IMMH	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg i.B.
CXCL	CXC-Chemokin Ligand	IMP	Innere(s) Membran Protein(e)
d	Tag(e)	inf.	infiziert
DAP	<i>Slow-growing, Dry Agar-Pitting Colony</i>		
DC	Dendritische Zelle		
DMSO	Dimethylsulfoxid		

iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase	PBS	<i>Phosphate-Buffered-Saline</i>
int	Intermediäre Expression	PCR	Polymerasekettenreaktion
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>	pDC	Plasmazytoide Dendritische Zelle
KBE	Koloniebildende Einheiten	PE	Phycoerythrin
kDa	Kilodalton	PerCP	Peridininchlorophyllprotein
KKK	Katzenkratzkrankheit	pfu	<i>Plaque Forming Units</i>
Konz.	Konzentration	REP-PCR	<i>Repetitive Extragenic Palindromic-PCR</i>
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus	RibC	Riboflavin C
lg	Dekadischer Logarithmus	rm	Rekombinant hergestellt, Murin
LPS	Lipopolysaccharid	RNA	Ribonukleinsäure
Mb	Megabasen	rpm	Umdrehungen pro Minute
M-CSF	Makrophagen-Kolonie- Stimulierender Faktor	RT	Raumtemperatur
mDC	Myeloide Dendritische Zelle	s	Sekunde(n)
MHC	Haupthistokompatibilitäts- komplex	S.	Seite
min	Minute(n)	s.c.	subkutan
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> = Bakterienzahl/Zellzahl-Verhältnis	SDS	Sodiumdodecylsulfat
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>	SNP	<i>Faster-growing, Smooth Non- agar-pitting Colony</i>
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium-bromid	sog.	sogenannt
MyD-88	<i>Myeloid Differentiation Factor-88</i>	ssRNA	Einzelstrang-RNA
NEDD	Naphtylethylendiamin- dihydrochlorid	Th	T-Helfer
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>	TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle	TNF	Tumor Nekrose Faktor
NO	Stickstoffmonoxid	TRIF	<i>TIR Domain-Containing Adaptor Inducing IFN-β</i>
OD	Optische Dichte	U	<i>Unit</i> , Internationale Einheit
OMP	Äußere(s) Membranprotein(e)	V	Volt
p.i.	post infectionem	v.a.	vor allem
p.s.	post stimulationem	v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>	VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
		w/v	Gewicht/Volumen-Verhältnis
		z.T.	zum Teil

1 Einleitung

Die Katzenkratzkrankheit (KKK) ist eine häufige und weltweit auftretende Zoonose, die bis auf wenige Ausnahmen Folge der Infektion eines immunkompetenten Menschen mit *Bartonella henselae* ist. Dieses Gram-negative Bakterium ist in seinem felinen Reservoir zur klinisch inapparenten Bakteriämie fähig, bei akzidentieller Infektion eines Menschen löst es jedoch abhängig vom individuellen Immunstatus vasoproliferative Veränderungen (vorwiegend bei HIV-positiven Patienten) oder aber Symptome einer KKK aus. Die KKK manifestiert sich typischerweise in Form einer lang andauernden, regionalen Lymphknotenschwellung, die zwar meist gutartig verläuft, aber eine wichtige Differentialdiagnose zu malignen Prozessen darstellt (43). In den USA wird mit einer jährlichen Inzidenzrate von 22.000 ambulanten (9,3/100.000 Einwohner) und mehr als 2.000 stationären Fällen gerechnet (120). Viele der Patienten mit KKK sind unter 18 Jahre alt, grundsätzlich aber kann die Erkrankung in jedem Lebensalter auftreten (120).

Es gibt mehrere Hinweise, dass bei der KKK der Erreger erfolgreich kontrolliert wird und die Krankheit letztendlich Folge eines immunpathogenetischen Prozesses ist (206). Das Wissen hierüber ist jedoch in Folge der eingeschränkten Untersuchungsmöglichkeiten am erkrankten Menschen begrenzt. Eine Möglichkeit, die Pathogenese der KKK intensiver zu studieren, böte ein Tiermodell. Naheliegende Tierart hierfür ist aufgrund ihrer gut charakterisierten Eigenschaften die Maus, für die auch der Verlauf einer i.p. oder i.v. Infektion mit *B. henselae* bereits bekannt ist (9, 124, 126, 201) und die wie der immunkompetente Mensch ein Fehlwirt für *B. henselae* zu sein scheint.

Eine Lymphadenopathie nach Infektion von Mäusen mit *B. henselae* wurde bisher nicht beschrieben. Es stellte sich im Rahmen der vorgelegten Arbeit deswegen die Frage, ob eine s.c. Infektion mit *B. henselae*, die eine Beteiligung des drainierenden Lymphknotens garantieren sollte, in der Maus eine Lymphadenopathie ähnlich der KKK des Menschen auslösen kann. Ein solches Modell würde es ermöglichen, zugrunde liegende Mechanismen wie die Beteiligung definierter Zellpopulationen oder Zytokine in immunkompetenten, aber auch immundefizienten Mäusen *in vivo* zu analysieren.

2 Literatur

2.1 Das Genus *Bartonella*

Als erster Vertreter des Genus *Bartonella* wurde 1909 *B. bacilliformis*, der Erreger der in den Anden Perus, Equadors und Kolumbiens endemisch auftretenden Carrion-Krankheit, durch den peruanischen Arzt Alberto Barton beschrieben (17). Erst 1993 bzw. 1995 wurden dem Genus *Bartonella* auch die zuvor als *Rochalimea* und *Grahamella* klassifizierten Bakterien zugeordnet (25, 37). Bis heute sind 22 verschiedene *Bartonella*-Spezies sowie 3 Subspezies weltweit aus zahlreichen verschiedenen Wirten des Tierreiches isoliert worden (64). Ihnen wird ein zunehmendes Spektrum an Erkrankungen von Mensch und Tier zugeschrieben (siehe Tabelle 1, S. 24).

Das Genus *Bartonella* wird wie seine nächsten Verwandten *Brucella* und *Agrobacterium* der α 2-Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet (37, 255). *Bartonella*-Spezies sind kleine (0,2 - 0,5 μm x 1,7 - 2,2 μm), pleomorphe Gram-negative Stäbchen. In nach üblichem Protokoll durchgeführten biochemischen Tests setzen sie keine Glucose um und sind Katalase-, Oxidase-, Urease-, sowie Nitratreduktase-negativ. Aufgrund ihres häminabhängigen Wachstums (215, 260) werden sie üblicherweise auf Nährmedium mit einem Zusatz von mindestens 5% Pferde-, Kaninchen- oder Schafblut bzw. auf Schokoladenagarplatten kultiviert. Mit Ausnahme von *B. bacilliformis* liegt die optimale Wachstumstemperatur bei 35 - 37°C. Bei Anwesenheit von 5% CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit können aus infiziertem Gewebe frühestens nach 5 - 15, z.T. erst nach 45 Tagen (168) typische kleine (1 - 3 mm Durchmesser), durchscheinende bis opake Kolonien angezüchtet werden. Diese sind bei einigen *Bartonella*-Arten wie *B. henselae* zunächst trocken und haften stark am Nährmedium, in dem nach dem Entfernen einer Kolonie eine Kuhle zurückbleibt. Nach mehreren Subkulturen ändert sich das Erscheinungsbild zu cremigen, bereits nach 2 - 5 Tagen sichtbaren Kulturen (38, 131, 142). Eine Kultivierung von *B. henselae* in der Nachbarschaft von *Staphylococcus epidermidis* beschleunigt das Wachstum von Kolonien (siehe auch Abbildung 1). Die Arten des Genus *Bartonella* weisen eine Übereinstimmung ihres 1,6 - 2,0 Mb großen Genoms von 82,8 bis 98,3% auf, basierend auf einem Vergleich mehrerer Gene (143). Der GC-Anteil liegt zwischen 38,5% für *B. quintana* (243) und 41,1% bei *B. vinsonii* (61).

Eine Gemeinsamkeit der *Bartonella*-Arten ist ihr fakultativ intrazelluläres, bevorzugt intraerythrozytäres Vorkommen. Sie weisen ein enges Wirtsspektrum auf und können im Reservoirwirt zu einer chronischen, oft ohne klinische Symptome verlaufenden,

intraerythrozytären Bakteriämie führen. Die Übertragung der Bartonellen erfolgt über blutsaugende Arthropoden wie Sandmücken, Zecken, Läuse oder Flöhe als Vektor. Die Infektion eines Nicht-Reservoirwirts kann zu einer Erkrankung führen, die in der Regel jedoch ohne intraerythrozytäre Bakteriämie einhergeht (35, 50, 122).

Als typische Beispiele für die genannten Eigenschaften wird in separaten Kapiteln auf die auch in dieser Arbeit verwendeten Vertreter *B. henselae* (Kapitel 2.4), *B. quintana* (Kapitel 2.2) und *B. grahamii* (Kapitel 2.3) eingegangen.

Aus veterinärmedizinischer Sicht sind Arten des Genus *Bartonella* sowohl als Erreger von Zoonosen als auch von spezifischen Erkrankungen bei Tieren von Bedeutung. Wohl am bekanntesten sind die bei Katze und Mensch auftretenden Infektionen mit *B. henselae* und der dadurch ausgelösten Katzenkratzkrankheit (KKK) (siehe Kapitel 2.4). Im Zusammenhang mit KKK wurde auch vereinzelt *B. clarridgeiae* beschrieben, deren Reservoirwirt ebenfalls die Katze ist (136, 218). Als weitere Zoonoseerreger, die bei humanen Patienten mit Endokarditis nachgewiesen wurden, gelten *B. elizabethae*, natürlicherweise bei Ratten auftretend, *B. koehlerae*, ursprünglich aus gesunden Katzen isoliert (74, 264), und *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* mit dem Hund als Reservoir (14, 61, 213). Ebenfalls zoonotisches Potential wird *B. vinsonii* subsp. *arupensis* mit dem Reservoirwirt Maus zugeschrieben, da dieses Bakterium aus dem Blut eines Patienten mit Fieber isoliert werden konnte (256). Aus der entzündeten Herzklappe eines Patienten mit Fieber konnte kürzlich *B. alsatica* angezüchtet werden, die bisher nur von Bakteriämien in gesunden wilden Kaninchen bekannt war (199). *B. grahamii* (siehe auch Kapitel 2.3) wurde mit einem Fall von Neuroretinitis beim Menschen in Verbindung gebracht (127) und wird deswegen ebenfalls zu den Zoonoseerregern gezählt; mit *B. grahamii* infizierte Mäuse zeigten trotz einer Bakteriämie keine Anzeichen einer Erkrankung (132). *B. washoensis* mit Nagetieren als Reservoirwirten wird als Auslöser eines Myokarditisfalls beim Menschen (137) angesehen, konnte aber auch aus einem Hund mit Endokarditis isoliert werden (51). Natürliche Infektionen mit *B. bovis* wurden in Rinderherden und bei Wildwiederkäuern sowie möglicherweise im Zusammenhang mit Bazillärer Angiomatose bei einem humanen Patienten nachgewiesen. Ein Zusammenhang mit Fertilitätsstörungen oder Milchleistung in Rinderherden konnte nicht festgestellt werden (160). Nach experimenteller Infektion von Ratten mit *B. tribocorum* trat eine zyklische Bakteriämie mit intraerythrozytärer Kolonisierung ähnlich dem Fünftagefieber beim Menschen, jedoch ohne erkennbare Krankheitssymptome auf (224). Mäuse, die experimentell mit *B. birtlesii* infiziert wurden, entwickelten Fertilitätsstörungen und übertrugen das Bakterium transplazentär (31). Eine Bedeutung als Krankheitserreger beim Hund hat *B.*

vinsonii subsp. *berkhoffii*, die bei dieser Tierart als eine Ursache von Endokarditis, kardialen Arrhythmien, Myokarditis, granulomatöser Lymphadenitis, granulomatöser Rhinitis und Epistaxis gilt. Auch werden immunhämolytische Anämie, Meningoencephalitis, Polyarthritits, kutane Vasculitis und Uveitis beim Hund in Zusammenhang mit *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* gebracht (34). Es ist jedoch auch bekannt, dass sowohl nach natürlicher als auch nach experimenteller Infektion von Hunden mit *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* trotz einer Bakteriämie nicht zwangsläufig schwerwiegende Krankheitssymptome auftreten (32, 50). Als weitere möglicherweise auch beim Hund pathogene *Bartonella*-Spezies gelten *B. henselae*, *B. elizabethae* und *B. clarridgeiae* (157, 171).

2.2 *Bartonella quintana*

Für *B. quintana* wurde eine natürliche Infektion bisher nur beim Menschen sowie in einem erst kürzlich publizierten Fall bei einem Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) (190) beschrieben. Überträger von *B. quintana* ist die Kleiderlaus (*Pediculus humanus*). Eine Infektion des Reservoirwirtes Mensch geht mit einer intraerythrozytären Bakteriämie (211) einher und kann sich in zyklischen Fieberschüben sowie Kopf-, Muskel-, Knochen- und Gelenkschmerzen manifestieren. Vor allem unter Soldaten des Ersten Weltkriegs war diese Erkrankung als Fünftagefieber, Wolhynisches Fieber oder Schützengrabenfieber (*Trench Fever*) weit verbreitet. Seit Ende des Zwanzigsten Jahrhunderts ist *B. quintana* vermehrt bei Erkrankungen von Obdachlosen und Drogenabhängigen (*Urban Trench Fever*) sowie als Erreger von vasoproliferativen Veränderungen bei HIV-positiven Patienten (Bazilläre Angiomatose) und als Auslöser von Endokarditiden aufgetreten. Jedoch zeigen auch viele mit *B. quintana* infizierte und chronisch bakteriämische Menschen kein Fieber oder sonstige Krankheitssymptome (187).

Seit 2004 ist das 1,58 bzw. 1,93 Mb große Genom von *B. quintana* bzw. *B. henselae* (6) vollständig sequenziert. Ein Vergleich dieser beiden Sequenzen legte die Herkunft von *B. quintana* aus einem größeren, ursprünglich *B. henselae*-ähnlichen Genom nahe, dessen Reduktion im Verlauf der Evolution um so mehr möglich wurde, je stärker sich das Bakterium auf einen einzigen Wirt und/oder Vektor spezialisierte. Insgesamt wurden nur 26 Gene im Genom von *B. quintana* gefunden werden, die nicht auch im Genom von *B. henselae* vorlagen (6).

2.3 *Bartonella grahamii*

Bartonella grahamii weist im Vergleich zu anderen *Bartonella*-Spezies eine weniger ausgeprägte Wirtsspezifität auf. Seit der Erstbeschreibung 1995 (25) konnte eine natürliche Infektion mit *B. grahamii* im Blut von Ratten, Mäusen und anderen Nagetieren nachgewiesen werden (24, 77). Als Vektor zwischen Rötelmäusen (*Clethrionomys glareolus*) wurde der Floh *Ctenophthalmus nobilis* identifiziert (33). Experimentell mit 2×10^9 KBE *B. grahamii* intravenös infizierte immunkompetente Mäuse entwickelten ab einer Woche p.i. eine transiente Bakteriämie ohne Anzeichen einer Erkrankung (132). Aufgrund des Nachweises von *B. grahamii*-DNA aus der intraokulären Flüssigkeit einer humanen Patientin mit Neuroretinitis wird diese Spezies als Zoonoseerreger angesehen (127).

2.4 *Bartonella henselae*

2.4.1 Allgemeines

1950 wurde von dem französischen Arzt Robert Debré zum ersten Mal die Katzenkratzkrankheit (KKK) als „la maladie des griffes de chat“ beschrieben (62). Er beobachtete eine regionale Lymphknotenschwellung bei Patienten, die zuvor von einer Katze gekratzt wurden. Es dauerte jedoch noch über 40 Jahre, bis der Erreger identifiziert werden konnte (zum klinischen Bild der KKK siehe auch Kapitel 2.4.3).

1983 konnten Wear et al. (253) erstmals feine, pleomorphe, stäbchenförmige Bakterien im veränderten Lymphknoten von Patienten mit KKK mittels Warthin-Starry-Silberfärbung nachweisen. Fünf Jahre später gelang English et al. (79) die vermeintlich erste Isolierung und Kultivierung dieses *cat scratch disease bacillus* aus dem Lymphknoten eines Patienten mit KKK. Dieser Erreger wurde 1991 als *Afipia felis* klassifiziert (36). Weitere Untersuchungen lieferten jedoch keine zusätzlichen Hinweise für diese Ätiologie der KKK, so dass *Afipia felis* heute nur noch eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung der KKK beigemessen wird (92). Eine Verbindung zwischen KKK und Bazillärer Angiomatose (BA) wurde zunächst aufgrund des histologischen und serologischen Nachweises ähnlicher Bakterien bei beiden Erkrankungen hergestellt (150). Die erste nähere Charakterisierung eines weiteren Erregers der BA neben *Rochalimea (Bartonella) quintana* erfolgte 1990 (205). Zur gleichen Zeit wurde ein mit *R. quintana* eng verwandtes Bakterium aus dem Blut von Patienten mit Fieber isoliert (230). 1992 fanden Regnery et al. (203) und Welch et al. (257) diese neue *Rochalimea*-Spezies im Blut und Gewebe von Patienten mit BA, Regnery et al. auch im Blut

gesunder Katzen (202). Zu Ehren der Mikrobiologin Diane Hensel wurde sie *Rochalimea henselae* benannt. Die Anzucht des Keimes aus dem Lymphknoten von Patienten mit KKK (72) sowie zahlreiche serologische (200, 204, 237) und molekularbiologische (7, 21, 95, 216) Arbeiten wiesen in der Folgezeit *Rochalimea henselae* als Haupterreger der KKK aus.

1993 zeigten Brenner et al. durch DNA-Hybridisierung und 16S rRNA-Sequenzierung die nahe Verwandtschaft von *Rochalimea henselae* mit *Bartonella bacilliformis*. Aus diesem Grund wurde der Erreger aus der Familie der *Rickettsiaceae* ausgegliedert, in *Bartonella henselae* umbenannt und entsprechend taxonomisch eingeordnet (37). Innerhalb der Spezies *B. henselae* werden heute bezüglich der 16S rRNA zwei Genotypen (22) und aufgrund weiterer molekularbiologischer Untersuchungen mehrere Varianten unterschieden (76, 118, 217, 270). Die Bedeutung von *B. henselae* als Zoonoseerreger, der bei immunkompetenten Individuen zur KKK, bei immundefizienten Menschen aber zu vasoproliferativen Veränderungen führen kann, ist inzwischen unbestritten.

2.4.2 Epidemiologie

B. henselae konnte bisher aus Katzen, die als natürliches Reservoir angesehen werden (130), sowie aus einigen anderen Feliden (Löwe, Gepard) isoliert werden (174). Abhängig von der Region weisen zwischen 5 und 80% der Katzen Antikörper gegen *B. henselae* auf; ebenfalls mit starken regionalen Schwankungen und in Abhängigkeit von der Haltung beträgt die Prävalenz einer Bakteriämie mit *B. henselae* in einer Katzenpopulation zwischen wenigen und 50%. Ein Überblick der hierzu erhobenen Daten ist in der Veröffentlichung von Boulois et al. zusammengestellt (32). Die Übertragung zwischen Katzen erfolgt hauptsächlich über den Katzenfloh (*Ctenocephalides felis*) (49), in dem auch eine Vermehrung der Bakterien möglich ist (111). Isolate aus Menschen stammen überwiegend aus immunsupprimierten Patienten, seltenst aus Patienten mit KKK. Über eine Infektion von Hunden mit *B. henselae* wird diskutiert (96, 171). Aufgrund dieses engen Wirtsspektrums wurde bisher von einer hohen Wirtsspezifität des Bakteriums ausgegangen. Diese Annahme ist inzwischen jedoch in Frage zu stellen, da eine Variante von *B. henselae* kürzlich auch aus Waldmäusen (*Apodemus sylvaticus*) isoliert wurde (78) und der Nachweis von *B. henselae*-DNA in Blutproben zweier Gewöhnlicher Schweinswale (*Phocoena phocoena*) gelang (159).

2.4.3 Infektionen der Katze mit *B. henselae*

Natürlich mit *B. henselae* infizierten Katzen wird kein spezifisches Krankheitsbild zugeordnet; sie gelten als klinisch inapparente Träger und natürliches Reservoir (130). Nur wenige Untersuchungen deuten bei Katzen auf einen Zusammenhang zwischen einer natürlichen Infektion und klinischen Symptomen hin. Die hohe Prävalenz von *B. henselae*-Bakteriämien in Katzenpopulationen erschwert die Zuordnung spezifischer klinischer Veränderungen (35, 48). Serologische Untersuchungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *B. henselae* und einem vermehrten Auftreten von Lymphadenopathie und Gingivitis bei Katzen hin, insbesondere bei gleichzeitiger Infektion mit dem Felinen Immundefizienz-Virus (244). Auch wurden bei seropositiven Katzen häufiger Veränderungen der Nieren und ableitenden Harnwege beobachtet (93). *B. henselae* wird auch als eine mögliche Ursache von Uveitis anterior bei Katzen angesehen (145).

Experimentelle Infektionen von Katzen mit *B. henselae* führten zu einem breiten Spektrum an Veränderungen und wiesen große Varianzen zwischen einzelnen experimentellen Ansätzen auf, für die die unterschiedliche Virulenz von *B. henselae*-Stämmen verantwortlich gemacht wird (102, 135, 189). Übereinstimmend wird über das Auftreten von Fieber über einen Zeitraum von wenigen Tagen bis zu einigen Wochen berichtet. Auch wurde an der Infektionsstelle die Entwicklung einer lokalen Entzündung (Rötung, Schwellung) beobachtet. Einige Tiere wiesen eine lokale oder generalisierte Lymphadenopathie auf. Weitere Symptome wie Lethargie und Anorexie sowie vereinzelt milde neurologische Abweichungen (Nystagmus, Tremor, vestibuläre Dysfunktion, Verhaltensänderungen) traten auf (101). Nach experimenteller Infektion von weiblichen Katzen mit *B. henselae* wurden Fertilitätsstörungen wie Totgeburten und niedrige Konzeptionsraten beobachtet (103).

2.4.4 Infektionen des Menschen mit *B. henselae*:

Vasoproliferative Veränderungen und Katzenkratzkrankheit

Eine Übertragung von *B. henselae* auf den Menschen erfolgt entweder direkt über Katzenkratzer, möglicherweise auch über Katzenbisse (43) oder aber indirekt durch blutsaugende Flöhe (*Ctenocephalides felis*) (49, 111, 212, 268) und evtl. Zecken (45, 153, 219). Daneben wird auch die Übertragung über infektiösen Flohkot diskutiert, in dem *B. henselae* mehrere Tage überlebensfähig ist (85, 111). Dieser könnte durch Kratzen in die Haut eingerieben werden und so zu einer Infektion mit *B. henselae* führen (85, 86). Die Isolation

von *B. henselae*-DNA aus einem Wadenstecher (*Stomoxys* spp.) wirft die Frage nach der Rolle dieser blutsaugenden Insekten als Vektor auf (52).

Der Verlauf der Infektion beim Menschen ist abhängig vom individuellen Immunstatus (siehe auch Abbildung 2). Während immunkompetente Menschen zwar Symptome einer KKK entwickeln, gleichzeitig *B. henselae* aber rasch eliminieren können, sind bei immunsupprimierten Patienten schwerwiegendere Verläufe mit Fieber und Bakteriämie sowie vasoproliferative Veränderungen die Regel. Häufigste klinische Manifestation bei diesen meist HIV-infizierten Patienten ist die Bazilläre Angiomatose (BA) (205, 235). Sie ist gekennzeichnet durch chronische, kutane oder subkutane vasoproliferative Läsionen ähnlich den Veränderungen bei der durch *B. bacilliformis* ausgelösten Verruga peruana und klinisch nicht unterscheidbar von Läsionen durch *B. quintana* (162). Histopathologisch sind eine lobuläre Proliferation von Blutgefäßen mit „epitheloiden“ Endothelzellen, eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen/Monozyten sowie zumeist mit Warthin-Starry-Silberfärbung anfärbbare Bakterien zu beobachten (54, 149). Ähnliche vasoproliferative Veränderungen können nach Infektion mit *B. henselae* auch in inneren Organen wie Milz, Leber, Knochenmark oder Lymphknoten auftreten. Hierbei entstehende blutgefüllte Zysten sind kennzeichnend für diese als Bazilläre Peliosis (BP) bezeichnete Erkrankung (231, 240). Klinisch geht eine BP oft einher mit Fieber, gastrointestinalen Symptomen und Hepatosplenomegalie (193). Nur selten tritt eine BA oder BP auch bei immunkompetenten Menschen auf (239). Bei beiden Erkrankungen wird von guten therapeutischen Erfolgen nach Gabe von Antibiotika (Erythromycin, Doxycyclin) berichtet (210). Eine Übersicht zur Pathogenese der durch *B. henselae* hervorgerufenen vasoproliferativen Veränderungen gibt Dehio (64, 65).

Eine durch *B. henselae* hervorgerufene Endokarditis tritt gehäuft bei Patienten mit Herzklappenveränderungen und Kontakt zu Katzen oder Katzenflöhen auf (87). Eine Anzucht aus dem veränderten Gewebe ist in der Regel nicht möglich, meistens wird *B. henselae*-DNA über PCR nachgewiesen.

Die bei immunkompetenten Menschen auftretende KKK manifestiert sich nach einer Inkubationszeit von drei bis zehn Tagen primär in Form einer kleinen rot-braunen Papel oder Pustel an der Stelle des Erregereintritts (klassischerweise Katzenkratzer/-biss) (43, 163). Im Anschluss daran (7 - 60 Tage nach Infektion) treten im Abflussgebiet der Primärläsion ein oder mehrere weiche, meist schmerzhaft regionale Lymphknotenschwellungen auf, die oft die einzigen klinischen Symptome der Erkrankung bleiben. Veränderte Lymphknoten erreichen ca. 2 - 3 Wochen nach Beginn der Symptomatik ihre durchschnittliche maximale

Größe von 1 bis 5 cm, vereinzelt bis zu 12 cm; die Ausprägung der Schwellung weist große Schwankungen zwischen verschiedenen Patienten auf. Bei einem typischen Verlauf der KKK nimmt die Schwellung innerhalb der folgenden Wochen bis Monate langsam wieder ab, so dass mit einer Spontanheilung nach 2 - 4 Monaten zu rechnen ist. In rund 10% der Fälle kommt es zu einer eitrigen Einschmelzung des Lymphknotens. Die Mehrheit der Patienten mit KKK bleibt afebril und ohne Anzeichen einer systemischen Erkrankung; nur gelegentlich treten Fieber, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Übelkeit oder Erbrechen auf, seltener Arthralgien, Myalgien, abdominelle Schmerzen, Exantheme oder Splenomegalie. Die Lymphadenopathie ist typisch für rund 80% aller Erkrankungsfälle nach einer Infektion mit *B. henselae*; in 5 - 20% der Fälle kommt es nach einer Infektion mit *B. henselae* zu einem schweren oder systemischen Verlauf (mit oder ohne Lymphadenopathie) mit teils atypischen Symptomen. Am häufigsten (6%) ist dabei das Okuloglanduläre Syndrom Parinaud, bei dem sich eine Infektion mit *B. henselae* am Auge als granulomatöse Konjunktivitis und Parotitis-ähnliche präaurikuläre Lymphadenopathie manifestiert. Auch neurologische Komplikationen (bei 1 - 7% der Patienten mit KKK) kommen vor wie z.B. eine aseptische Meningitis oder eine Neuroretinitis, die klinisch zu zentralnervösen Ausfällen führen. Seltene, systemische Verlaufsformen sind gekennzeichnet durch persistierendes hohes Fieber, generalisierte Lymphknotenschwellungen, Gewichtsverlust, Hepatosplenomegalie, Abszesse in Milz oder Leber, Osteomyelitis, atypische Pneumonien, Pleuraergüsse, paravertebrale Abszesse, Glomerulonephritis, oder hämolytische Anämie mit Hepatosplenomegalie, thrombozytopenischer Purpura und Eosinophilie (8, 18, 43, 163, 214). In Einzelfällen sind auch rheumatische Veränderungen nach Infektionen mit *B. henselae* beschrieben (5, 15, 43, 104, 106, 121). Es wurde immer wieder mit mäßigem Erfolg versucht, den unterschiedlichen Verlaufsformen der KKK eine bestimmte Variante von *B. henselae* zuzuordnen (22, 216, 217, 259). Bessere Ergebnisse ließen sich mittels *Multilocus Sequence Typing* (MLST) erzielen, die auch Hinweise für einen horizontalen Gentransfer lieferten (118).

Der Verdacht einer KKK wird meist aufgrund einer auffälligen Lymphknotenschwellung nach Kontakt zu Katzen oder Flöhen geäußert. Eine Abklärung der Diagnose erfolgt gewöhnlich anhand des Nachweises *B. henselae*-spezifischer Antikörper im Patientenserum mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IFT). Serum-IgM-Titer steigen nach Infektion an bis zu einem Maximum nach rund vier Wochen und fallen dann langsam wieder unter die Nachweisgrenze ab. Messbare IgG-Titer treten in der Regel 1 - 2 Wochen nach Beginn der Erkrankung auf und erreichen hohe Maximalwerte rund 7 - 8 Wochen nach Beginn der Erkrankung, um dann individuell unterschiedlich zu persistieren oder langsam wieder

abzufallen. IgG-Titer $\geq 1:512$, ein vierfacher IgG-Titeranstieg oder eine Serokonversion gelten als diagnoseweisend (2). Die Anzucht von *B. henselae* aus Lymphknotenmaterial oder Blut von immunkompetenten Patienten mit KKK gelingt nur selten; Fournier et al. (88) berichten mit 20,5% positiven Kulturen die höchste Anzuchtrate. Aus diesem Grund wird in der Diagnostik ein spezifischer Erregernachweis vermehrt über den Nachweis von *Bartonella*-DNA in Lymphknotenbiopsien oder -aspiraten geführt (2). Die Sensitivität der PCR ist sehr hoch (259), abhängig von Zielgen und PCR-Bedingungen kann sie jedoch ab dem 3. Erkrankungsmonat deutlich abfallen (207). Bei der zur Diagnose der KKK ebenfalls verwendeten Histologie können verschiedene Entwicklungsstadien der KKK beobachtet werden: In frühen Stadien finden sich eine lymphoide und retikuläre Hyperplasie sowie arterioläre Proliferationen; in späteren Stadien entwickeln sich epitheloidzellige Granulome, häufig mit Langhans-Riesenzellen und einem hohen Anteil an B-Zellen; im weiteren Verlauf kommt es teils zur Fusion der Granulome, zu zentralen nekrotischen Arealen und zur Infiltration mit neutrophilen Granulozyten, woraus Mikroabszesse entstehen können (43, 81, 133, 134).

Differentialdiagnostisch zu einer Lymphadenopathie durch *B. henselae* müssen v.a. maligne Prozesse, aber auch Infektionen mit anderen Erregern (z.B. *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis*, atypische Mykobakterien, Epstein-Barr-Virus, Zytomegalievirus) in Erwägung gezogen werden.

Die Therapie einer Infektion immunkompetenter Menschen mit *B. henselae* richtet sich nach dem klinischen Erscheinungsbild: Bei typischer KKK wird aufgrund des üblicherweise selbstlimitierenden Verlaufs, der durch eine Antibiotikagabe nicht beeinflusst wird, keine spezifische Therapie empfohlen. Gegebenenfalls sind eine Schmerztherapie und eine Entlastung suppurativer Lymphknoten durch Punktion indiziert. Zur Therapie komplizierter Verlaufsformen wird eine Gabe von Azithromycin oder Doxycyclin und Rifampicin genannt (210).

2.4.5 Virulenzfaktoren von *B. henselae*

Bisher sind nur einige genetisch definierte Virulenzfaktoren von *B. henselae* bekannt: (i) Das VirB/VirD4 Typ IV Sekretionssystem, dessen Prototyp beim pflanzenpathogenen *Agrobacterium tumefaciens* beschrieben wurde, nimmt Einfluss auf Endothelzellfunktionen durch den Transfer der Effektorproteine BepA - BepG (220, 223) und ist im Ratteninfektionsmodell mit *B. tribocorum* essentiell für die Entwicklung einer

intraerythrozytären Bakteriämie (222). (ii) Das trw Typ IV Sekretionssystem, das eng verwandt ist mit dem Konjugationssystem des *Escherichia coli* Plasmids R388, ist neben möglicherweise weiteren Funktionen ebenfalls essentiell für die Etablierung einer intraerythrozytären Bakteriämie in einem Ratteninfektionsmodell mit *B. tribocorum* (227). (iii) Das mit 340 kDa größte zurzeit bekannte bakterielle Protein BadA vermittelt als Nichtfimbrien-Adhäsion sowohl bakterielle Autoaggregation als auch die Adhäsion zu extrazellulären Matrixproteinen, Epithel- und Endothelzellen, unterliegt einer hohen Mutationsrate und scheint v.a. bei der Induktion vasoproliferativer Läsionen eine Rolle zu spielen (208). (iv) Der innerhalb des Genus *Bartonella* hoch konservierte invasionsassoziierte Locus (*ialB*) verbessert die Anlagerung von *B. bacilliformis* an humane Erythrocyten, eine Funktion für *B. henselae* ist aber nicht gesichert (55, 65, 172). Erst kürzlich wurde ein zur Familie der Autotransporter homologer *CAMP-like Factor* (*Cfa*) von *B. henselae* beschrieben, der als Cohämolysin bei Kultivierung von *B. henselae* in der Nachbarschaft von *S. aureus* eine zusätzliche Hämolyse auslöst und so ebenfalls einen potentiellen Virulenzfaktor darstellt (152).

Die Aufnahme von Hämin wird *B. henselae* durch mindestens fünf membranständige Proteine ermöglicht, am bedeutendsten hiervon und damit vermutlich ein wichtiger Pathogenitätsfaktor ist das Protein Pap31 (271). Von verschiedenen äußeren Membranproteinen, v.a. von einem 43kDa großen Protein (*Omp43*) von *B. henselae*, wird berichtet, dass sie an Endothelzellen binden und so möglicherweise eine Invasion in diese Zellen ermöglichen (41, 42). Aus dem Kulturüberstand von *B. henselae* konnte ein Deformin genanntes Molekül isoliert werden, das auch von *B. bacilliformis* abgegeben wird und das in diesem Zusammenhang verantwortlich gemacht wird für die Bildung von Invaginationen in humanen Erythrozytenmembranen (20, 68, 110, 262). Die verschiedenen genannten Virulenzfaktoren sind von Dehio in Übersichtsarbeiten zusammengestellt (64, 65).

2.4.6 Pathogenese der Katzenkratzkrankheit

Über die Pathogenese speziell der KKK ist bisher wenig bekannt. Da im Erkrankungsfall der Nachweis lebender Bakterien nur selten gelingt, drängt sich die Frage nach einer immunologischen Reaktion als Ursache der klinischen Symptome auf (206). Der in früheren Jahren zur Diagnose der KKK verwendete Hauttest, bei dem Material aus durch KKK veränderten Lymphknoten intradermal appliziert wird und im positiven Fall eine Reaktion ähnlich der Tuberkulinreaktion (Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ) auftritt, lässt auf

eine starke zelluläre Immunantwort schließen (91, 225). Auch konnten Lymphozyten eines an der KKK erkrankten Patienten durch Stimulation mit *B. henselae* spezifisch zur Proliferation angeregt werden (10). Die Anwesenheit von IFN- γ -produzierenden, proliferierenden CD3⁺ Zellen sowie aktivierten Makrophagen in Gewebeschnitten bei KKK sowie die bereits erwähnte Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ zeigen, dass nach der Infektion mit *B. henselae* beim Menschen eine T-Helfer (Th) 1-vermittelte Immunantwort induziert wird (82, 226). Naive T-Zellen differenzieren nach Aktivierung durch ihr spezifisches Antigen in Abhängigkeit von dem sie umgebenden Zytokinmilieu zu Th1- oder Th2-Effektorzellen, die sich funktionell unterscheiden (47). Die durch Th1-Zellen sezernierten Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF führen zur Aktivierung von zellulären Effektormechanismen, die für die Abtötung intrazellulärer Erreger von Bedeutung sind (29, 177, 181, 228); sie vermitteln aber auch immunpathologische Effekte und verursachen bei Fehlregulation autoimmune Erkrankungen (151, 186, 198). Eine Th2-Immunantwort hingegen steuert durch die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 die humorale Immunität gegen extrazelluläre Erreger über die Aktivierung von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie B-Zellen. Im Serum von Patienten mit KKK konnten erhöhte Werte des möglicherweise die T-Zell-Immunantwort fördernden IL-2, des proinflammatorischen Zytokins IL-6, aber auch des die Entzündungsreaktion wieder hemmenden IL-10 gemessen werden. Erhöhte Werte an IL-4, IL-12 und IFN- γ wurden in diesen Seren nicht gemessen (191). Im immunkompetenten Menschen könnte die lokale Freisetzung von IFN- γ nach Infektion mit *B. henselae* und die dadurch bedingte Aktivierung von Makrophagen ein möglicher Grund für die gewöhnlich rasche Elimination des Bakteriums darstellen. Ein Hinweis hierfür bietet der Nachweis apoptotischer Makrophagen in bei der KKK auftretenden Granulomen, die möglicherweise zur Abtötung der Bakterien ihren eigenen Zelltod einleiten (226). In diesen Granulomen wurde außerdem die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) nachgewiesen (82). Dieses Enzym setzt große Mengen an Stickstoffmonoxid (NO) frei, dessen bakterizider Effekt auf *B. henselae* *in vitro* bekannt ist (182). Weitere *in vitro*-Untersuchungen mit vorwiegend murinen Zellen unterstützen die Theorie einer Th1-Immunantwort nach Infektion mit *B. henselae*: So setzten Milzzellen aus infizierten Mäusen nach Restimulation mit inaktivierten *B. henselae* IFN- γ , nicht jedoch IL-4 (9) und Milzzellen aus naiven Mäusen nach Infektion mit *B. henselae* IFN- γ und das proinflammatorische Zytokin IL-12 (206) frei. Mit *B. henselae* infizierte Makrophagen der Zelllinie J774 reduzierten die Bakterienzahl vor allem nach Präinkubation mit IFN- γ innerhalb von 24 Stunden deutlich und sezernierten die Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 (182). In Versuchen

mit humanen neutrophilen Granulozyten beobachteten Fumarola et al. hingegen nach Infektion mit *B. henselae* eine Beeinträchtigung der Zellen in der Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, was möglicherweise für eine Überlebensfähigkeit von *B. henselae* in diesen Zellen verantwortlich sein könnte (90). Einen Einfluss auf das Überleben extrazellulärer *B. henselae* im Säugetierwirt hat vermutlich auch das humorale Immunsystem. So konnte *in vitro* eine hohe Anfälligkeit von *B. henselae* gegenüber Serum- oder komplementvermittelter Zellyse beobachtet werden (209) und die im Serum von Patienten mit KKK gefundenen IgG-Subtypen sprechen für eine Opsonisierung der Bakterien *in vivo*, die eine anschließende Elimination durch phagozytierende Zellen erleichtert (169). Als Ursache für die fehlende Kontrolle einer Infektion mit *B. henselae* in immunsupprimierten Patienten wird eine verminderte Anzahl bzw. Aktivität von CD4⁺ T-Helfer Zellen und phagozytierenden Zellen und dadurch u.a. auch eine geringe Produktion des anti-vasoproliferativen Zytokins IL-12 diskutiert (125, 191, 206).

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass eine *B. henselae*-Bakteriämie ohne Symptome einer Sepsis (122), wie man es für ein Gram-negatives Bakterium mit einem hohen Anteil an LPS erwarten würde, einhergehen kann (80). Die Ursache dieses geringen endotoxischen Potentials liegt vermutlich in der Struktur des LPS, das im Vergleich zu LPS von *Salmonella enterica* um einen Faktor 1000 - 10000 schlechter über *Toll-like* Rezeptor (TLR) 4 aktivierend wirkt (266). TLR4 gehört zur Familie der *Toll-like* Rezeptoren, die der Gruppe der *Pattern Recognition* Rezeptoren zugeordnet wird. Diese Rezeptoren binden zahlreiche konservierte Komponenten von Mikroorganismen wie z.B. LPS oder unmethylierte DNA (sog. *Pathogen-associated Molecular Patterns* (PAMPs)) und führen über einen intrazellulären Signalweg zur veränderten Genexpression und dadurch zur Aktivierung der Zelle. Im Rahmen einer Infektion ist so eine rasche Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems möglich, die dann durch Freisetzung von Zytokinen und Präsentation von Antigenen die Ausbildung einer antigen-spezifischen, adaptiven Immunantwort fördern. Mindestens 11 verschiedene TLRs sind bis heute bekannt (119, 123, 238). Für *B. henselae* als intaktes Bakterium wurde eine Interaktion und Aktivierung von Zellen über TLR2 beschrieben, was so auch die Immunantwort *in vivo* beeinflussen könnte (248). Als Folge einer zellulären Immunantwort werden die bei der KKK auftretenden histopathologischen Veränderungen angesehen (206), die sich von Granulomen, wie sie zum Beispiel bei Tuberkulose auftreten (59), durch einen großen Anteil an neutrophilen Granulozyten und monozytoiden B-Zellen unterscheiden (81, 133, 134, 248). An der Entstehung der Granulome sind wahrscheinlich dendritische Zellen (DC), die durch Kontakt zu *B. henselae* reifen, als

antigenpräsentierende Zellen in Lymphknoten gelangen und dort eine effektive Immunantwort des adaptiven Immunsystems auslösen können, maßgeblich beteiligt (248). Aufgrund von *in vitro*-Experimenten und histologischen Untersuchungen postulieren Vermi et al. eine lokale Freisetzung von Zytokinen (IL-10, TNF- α , IL-6) und Chemokinen (v.a. CXCL13) durch *B. henselae*-infizierte DC. Dies könnte im Lymphknoten eine Ansammlung und Differenzierung von monozytoiden B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen auslösen und die Formierung B-Zell-reicher Granulome bedingen. Auch eine Migration und Aktivierung von Makrophagen in Assoziation mit Granulomen bei KKK wurde histologisch beobachtet (226).

2.5 Fragestellung der Dissertationsarbeit

Wie bereits beschrieben ist die KKK des Menschen im Wesentlichen gekennzeichnet durch eine rasche Erregerkontrolle bei gleichzeitiger Entwicklung einer gutartigen, aber lang andauernden regionalen Lymphadenopathie. Das Wissen über die Pathogenese dieser Erkrankung ist jedoch aufgrund der eingeschränkten Untersuchungsmöglichkeiten am erkrankten Menschen begrenzt. Rückschlüsse auf eine Immunpathogenese der Erkrankung wurden v.a. anhand von klinischen und histologischen Befunden sowie einzelnen *in vitro*-Experimenten gezogen. Weitere Daten stammen aus Experimenten, in denen Mäuse mit *B. henselae* infiziert wurden (9, 124, 126, 201, 246, 247). Im Vordergrund dieser Untersuchungen stand der Infektionsverlauf nach intraperitonealer oder intravenöser Infektion mit Milz, Leber und Blut als Zielorganen, nicht jedoch eine sich möglicherweise entwickelnde Lymphadenopathie. Diese käme der KKK des Menschen näher und würde im Mausmodell eine eingehende Untersuchung der zugrundeliegenden, immunologischen Vorgänge erlauben. Aufgabe der vorgelegten Arbeit war die Etablierung eines Tiermodells der KKK. Als Modellorganismus wurde die Maus gewählt, da sie leicht zu halten, aufgrund ihrer häufigen Verwendung in Tiermodellen gut charakterisiert und durch Inzucht standardisiert ist. Ein weiterer Grund war die rasche Elimination der Bakterien durch den Wirt Maus nach i.p. oder i.v. Infektion (9, 124, 126, 201). Dies spricht dafür, dass die Maus wie auch der immunkompetente Mensch ein Fehlwirt für *B. henselae* darstellt. In Analogie zur Infektion des Menschen wurde der subkutane Infektionsweg gewählt, wodurch auch die Beteiligung eines drainierenden Lymphknotens sichergestellt wurde. In initialen Versuchen im Labor von PD Dr. Anna Sander konnte auf diese Weise eine Schwellung des lokalen Lymphknotens induziert werden.

Aufbauend auf diesen Beobachtungen sollte in der vorgelegten Arbeit der Infektionsverlauf analog zu den in der humanmedizinischen Diagnostik der KKK üblichen Verfahren analysiert werden. Weiterhin stellte sich aufgrund der raschen Erregerkontrolle und der sich trotzdem entwickelnden lang andauernden Lymphadenopathie die Frage der prinzipiellen Notwendigkeit lebender Bakterien für deren Induktion, sowie die Frage nach dem Infektionsverlauf und Krankheitsbild in immundefizienten Mäusen, die möglicherweise nicht zu einer effizienten Erregerelimination fähig sind. Da in den bisher in der Literatur beschriebenen Mausexperimenten eine Abhängigkeit der Symptome vom jeweiligen *B. henselae*-Isolat beobachtet wurde (9, 201, 246), sollten mehrere verschiedene Isolate verwendet werden.

Im Weiteren stellte sich die Frage nach den Mechanismen, die an der Entstehung der Lymphadenopathie beteiligt sind und letztendlich zu der beobachteten massiven Zunahme der Gesamtzellzahl des Lymphknotens führen. Als Ursache hierfür kamen grundsätzlich eine vermehrte Zellproliferation, eine vermehrte Einwanderung von Zellen und/oder eine Hemmung der Apoptose in Frage. Als Voraussetzung für diese Vorgänge wurde eine Aktivierung von murinen Immunzellen durch *B. henselae* angesehen, die in *in vitro*-Experimenten anhand der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen untersucht werden sollte. Besonderer Schwerpunkt lag hierbei auf der Induktion von Typ I Interferonen (Interferon α/β), die aufgrund ihrer zahlreichen immunregulatorischen Eigenschaften und ihrer Beteiligung an der Kontrolle von pathogenen Mikroorganismen näher untersucht wurden (23, 30). Dies sollte ergänzt werden durch entsprechende *in vivo*-Versuche zur Proliferation und Einwanderung definierter Zellpopulationen in drainierende Lymphknoten nach s.c. Infektion von Mäusen mit *B. henselae*.

Tabelle 1: *Bartonella*-Arten, Reservoir, Vektor und Erkrankungen (modifiziert nach (64))

Art	Reservoir	Vektor	Erkrankung
<i>B. bacilliformis</i>	Mensch	Sandmücke	Mensch: Carrión-Krankheit (Oroya-Fieber und Verruga peruana)
<i>B. quintana</i>	Mensch	Kleiderlaus	Mensch: Fünftagefieber, (Wolhynisches Fieber, Schützengrabenfieber, „trench fever“); persistente Bakteriämie; Endokarditis; Bazilläre Angiomatose
<i>B. alsatica</i>	Kaninchen	?	Mensch: Endokarditis mit Fieber
<i>B. bovis</i>	Rind, Katze	?	Mensch: Bazilläre Angiomatose?
<i>B. clarridgeiae</i>	Katze	Katzenfloh	Mensch: KKK
<i>B. elizabethae</i>	Ratte	?	Mensch: Endokarditis; Neuroretinitis
<i>B. grahamii</i>	Maus, Wühlmaus	Floh?	Mensch: Neuroretinitis
<i>B. henselae</i>	Katze	Katzenfloh	Mensch: KKK; Endokarditis; Bazilläre Angiomatose; Bazilläre Peliose; Neuroretinitis; Bakteriämie mit Fieber Katze: ?
<i>B. koehlerae</i>	Katze	?	Mensch: Endokarditis
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Maus	Zecke	Mensch: Bakteriämie mit Fieber
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Hund	Zecke	Mensch: Endokarditis Hund: Endokarditis; Myokarditis; Lymphadenitis; Rhinitis
<i>B. washoensis</i>	Erdhörnchen	?	Mensch: Myokarditis Hund: Endokarditis
<i>B. birtlesii</i>	Maus	?	Maus: Fertilitätsstörungen
<i>B. capreoli</i>	Rehwild	?	?
<i>B. chomelii</i>	Rind	?	?
<i>B. doshiae</i>	Wühlmaus	?	?
<i>B. peromysci</i>	Maus, Hirsch	?	?
<i>B. phoceensis</i>	Ratte	?	?
<i>B. rattimassiliensis</i>	Ratte	?	?
<i>B. schoenbuchensis</i>	Rehwild	Hirschlausfliege	?
<i>B. talpae</i>	Maulwurf	?	?
<i>B. taylorii</i>	Maus, Wühlmaus	?	?
<i>B. tribocorum</i>	Ratte	?	Ratte: zyklische Bakteriämie
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Wühlmaus	Ohrmilbe	?

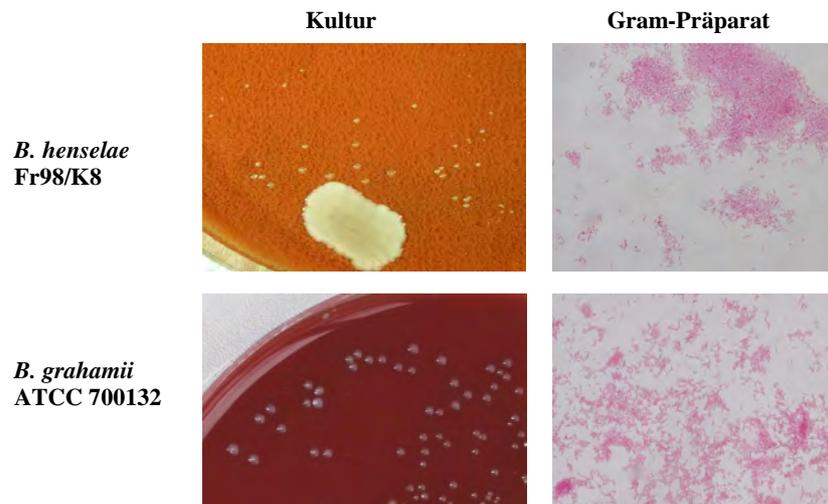


Abbildung 1 Fotografie der Kulturen und Gram-Färbungen von *B. henselae* Fr98/K8aM (Hämatinagar + *Staphylococcus epidermidis* als Amme) sowie *B. grahamii* ATCC 700132 (HCB-Agar)

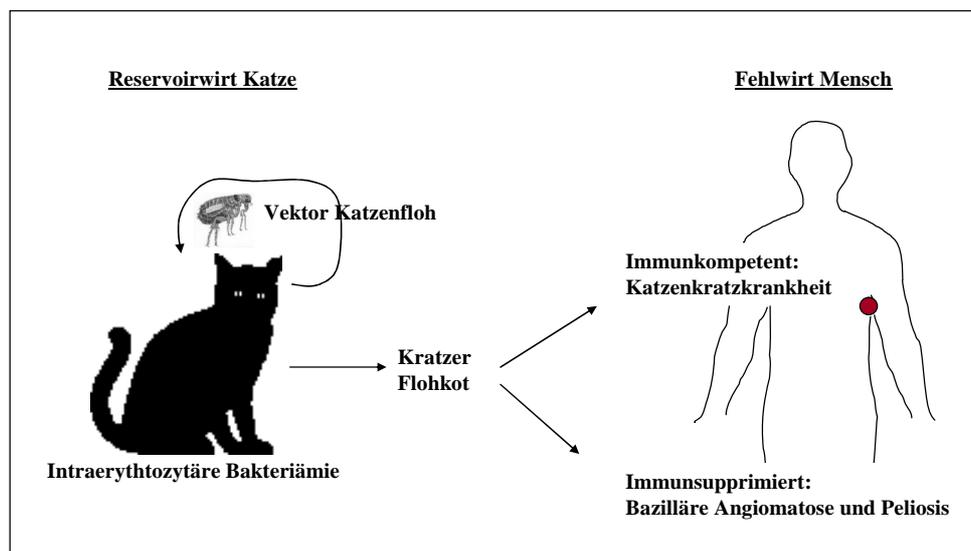


Abbildung 2 *Bartonella henselae* Infektion im Reservoirwirt Katze und Fehlwirt Mensch, modifiziert nach (64).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Nährmedien, Lösungen und Puffer

In dieser Arbeit verwendete Nährmedien, Lösungen und Puffer sind im Anhang aufgelistet. Weitere Verbrauchsmaterialien werden im Zusammenhang mit der Beschreibung der angewandten Methoden genannt.

3.1.2 Bakterien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterien und deren Herkunft sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Dort genannte Primärisolate wurden in den Jahren 1995 - 2002 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Freiburg (IMMH) aus Blut von Katzen angezüchtet. Diese Tiere wurden jeweils anlässlich einer klinisch und durch Antikörpernachweis gesicherten Katzenkratzkrankheit ihrer Besitzer untersucht. *B. henselae* Fr96/K2 - K6, Fr99/K9 - K12 bzw. Fr00/K13 - K15 stammen von verschiedenen Katzen jeweils desselben Haushalts. *B. henselae* Fr02/K16 konnte zusammen mit *B. clarridgeiae* aus dem Blut einer Katze angezüchtet werden.

Die Isolate wurden nach ihrer Anzucht koloniemorphologisch, biochemisch, gaschromatographisch und mittels spezifischem DNA-Nachweis als *B. henselae* identifiziert und nach einer definierten Anzahl von *in vitro*-Passagen in glycerinhaltigem Medium bei -80°C eingefroren. Die Stämme Fr96/K2 - K6 sowie Fr97/K7 wurden durch Sander et al. bereits näher beschrieben (217). Für die vorliegende Arbeit wurden die Stämme aus der Stammsammlung des ehemaligen Konsiliarlabors für Bartonellen wieder in Kultur genommen.

Tabelle 2: verwendete Bakterien

Art	Stamm	Isoliert aus...	Herkunft / Referenz
<i>Bartonella henselae</i>	ATCC 49882 = Houston 1	bakteriämischen HIV-Patienten (Referenzstamm)	ATCC / Regnery et al. 1992 (203)
	Fr98/K8	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / vorliegende Arbeit
	Fr98/K8aM	Isolat aus mit <i>B. henselae</i> Fr98/K8 infizierter Maus	vorliegende Arbeit
	Fr96/K2	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / Sander et al. 1998 (217)
	Fr96/K4	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / Sander et al. 1998 (217)

Art	Stamm	Isoliert aus...	Herkunft / Referenz
	Fr96/K5	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / Sander et al. 1998 (217)
	Fr96/K6	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / Sander et al. 1998 (217)
	Fr97/K7	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / Sander et al. 1998 (217)
	Fr99/K9	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / vorliegende Arbeit
	Fr99/K10	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / vorliegende Arbeit
	Fr99/K11	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / vorliegende Arbeit
	Fr99/K12	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / vorliegende Arbeit
	Fr00/K13	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / vorliegende Arbeit
	Fr00/K14	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / vorliegende Arbeit
	Fr00/K15	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / vorliegende Arbeit
	Fr02/K16	Katze, deren Besitzer an KKK erkrankt war	IMMH / vorliegende Arbeit
	Marseille	Patient mit KKK (Referenzstamm)	K / Drancourt et al. 1996 (73)
	Marseille BadA -	BadA-depletierte Mutante	K / Riess et al. 2004 (208)
<i>Bartonella grahamii</i>	CIP 107024 = ATCC 700132	Rötelmaus (<i>Clethrionomys glareolus</i>) (Referenzstamm)	CIP / Birtles et al. 1995 (25)
<i>Bartonella quintana</i>	CIP 103739 = Toulouse	Mensch (Referenzstamm)	CIP / Raoult, 1993
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		Katze (Amme für Primärisolate von <i>B. henselae</i>)	IMMH

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA; **CIP:** Collection de l'Institut Pasteur, Paris, Frankreich; **IMMH:** Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum, Freiburg; **K:** PD Dr. V. A. J. Kempf, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

3.1.3 Mäuse

In Tabelle 3 sind die verwendeten Mausinzuchtstämme und immundefizienten Mausstämme sowie deren Herkunft aufgeführt.

Weibliche Mäuse (Alter 6 - 12 Wochen) der Inzuchtstämme C57BL/6NCrl (C57BL/6) bzw. BALB/c AnNCrl (BALB/c) wurden von Charles River Laboratories, Sulzfeld, bezogen. Für Versuche mit immundefizienten Mäusen musste vereinzelt auf männliche Tiere zurückgegriffen werden. Auf die Zusammenstellung in Alter und Geschlecht homogener Gruppen innerhalb eines Versuches wurde dabei geachtet.

Die Tiere wurden spezifisch-pathogenfrei in Käfigen des Typs VentiRack™ (Fa. BioZone, Margate, UK) gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Futter (Altromin 1314, Alleinfuttermittel, spezialbehandelt, Fa. Altromin, Lage). Sollte die Proliferation von Zellen *in vivo* untersucht werden, wurde das Trinkwasser mit 0,8 mg/ml 5-Bromo-2`-deoxyuridine (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) angereichert, in lichtundurchlässigen Flaschen angeboten und alle 1,5 Tage erneuert.

Der Allgemeinzustand der Tiere wurde regelmäßig kontrolliert.

Tabelle 3: verwendete Mausstämme

Mausstamm	Abkürzung	Originalbeschreibung	Generation der Rückkreuzung	Bezugsquelle
C57BL/6NCrI	C57BL/6	C.C. Little, 1937 (Züchter)		CR
C57BL/10JCrI	C57BL/10	C.C. Little, 1937 (Züchter)		CR
C57BL/10ScN	TLR4-/-	(197, 251)		MF
BALB/c AnNCrI	BALB/c	H.J. Bagg, 1913 (Züchter)		CR
C57BL/6 gp91phox-/-	gp91phox-/-	(196)	F 19	JL
C57BL/6 iNOS-/-	iNOS-/-	(146)	F 12	JL
C57BL/6 RAG1-/-	RAG1-/-	(175)	F 22	JL
BALB/c CD1-/-	CD1-/-	(232)	F 7	JL
C57BL/6 MyD88-/-	MyD88-/-	(1)	F 8	WH
C57BL/6 <i>lps2</i> -/-	TRIF-/-	(113, 114)		PS
C57BL/6 TLR9-/-	TLR9-/-	(109)	F 10	HW
C57BL/6 IFNAR-/-	IFNAR-/-	(178)	F 10	UK

CR: Charles River Laboratories, Sulzfeld; **JL:** The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA; **MF:** Marina Freudenberg, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg; **WH:** Heike Weighardt, Bernhard Holzmann, TU München; **HW:** Antje Heit, Hermann Wagner, TU München; **UK:** Ulrich Kalinke, Paul-Ehrlich-Institut, Langen; **PS:** Peter Stäheli, Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, Freiburg

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der Bartonellen

Die verwendeten Bakterien wurden in glycerinhaltigem Medium zusammen mit sterilen Perlen bei -80°C gelagert. Nach Bedarf wurden einzelne Perlen mit einer sterilen Kanüle entnommen und das daran anhaftende Bartonellenreiche Medium mit einer Öse auf der entsprechenden Agarplatte verteilt und inkubiert. Um die Bakterien in Kultur zu halten, wurden sie je nach Stamm alle 3 - 6 Tage mit einer sterilen Platinöse dicht auf eine neue Agarplatte übertragen. *B. henselae*-Stämme sowie *B. quintana* wurden auf Hämataragarplatten, *B. grahamii* auf HCB-Agarplatten bei 37°C in 5%iger CO_2 -Athmosphäre

in einem Brutschrank (NuAire-US Autoflow Inkubator, Modell NU4500 E, Fa. Zapf Instruments, Sarstedt oder Brutschrank für Zellkulturen, Typ KB 600 K CO₂, Fa. Heraeus, Hanau) kultiviert.

Primärisolate von *B. henselae* wurden zusammen mit *Staphylococcus epidermidis* als Amme auf einer höchstens 5 Tage alten Agarplatte kultiviert, wobei der Abstand zwischen Amme und *B. henselae* maximal 1,5 cm betrug.

3.2.2. Ernten der Bartonellen

Die Bartonellen wurden für Mausinfektionsversuche nach dreitägiger (Referenzstämme) bzw. viertägiger (Primärisolate) Anzucht auf entsprechendem Nährboden mit einer sterilen Platinöse geerntet und in sterilfiltriertem, LPS-freiem PBS möglichst homogen resuspendiert. Zur Infektion von Zellen wurden die Bartonellen jeweils einen Tag kürzer angezüchtet und in jenem Medium, in dem auch die Zellen kultiviert wurden, resuspendiert.

Die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) wurde anhand der optischen Dichte (OD) bei 600nm (Ultrospec 2100 *pro*, Fa. Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) eingestellt, ausgehend von einer OD₆₀₀ 0,55 (PBS) bzw. 0,5 (Zellkulturmedium) bei ungefähr 1×10^8 KBE/ml. Die tatsächliche Anzahl der KBE/ml wurde durch ausplattierte sequentielle Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension bestimmt.

3.2.3 Inaktivierung der Bartonellen

Für einzelne Versuche wurden die eingerührten Bakterien durch Hitze (15 min Inkubation bei 95°C) bzw. 3 x 5 min Ultraschallbehandlung auf Eis (Mikrotip, pulsed, 40% duty cycle, output 6, Sonifier cell disrupter B15, Fa. Branson, Danbury, USA) inaktiviert. Zur Sterilitätskontrolle wurde ein Aliquot der inaktivierten Bakterien für drei Wochen auf entsprechendem Nährboden inkubiert.

3.2.4 Aufreinigung der Membranproteine von Bartonellen

Zur Aufreinigung und Auftrennung der inneren und äußeren Membranproteine wurden die Bartonellen von je 50 bis 60 gut gewachsenen Agarplatten geerntet, in PBS resuspendiert, abzentrifugiert (6000xg, 10 min, 4°C) und zwei Mal mit HEPES-NaCl-Puffer (20 mM HEPES, 25 mM NaCl, pH 7.6) gewaschen (6000xg, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde dann in

Lysis-Puffer (20 mM HEPES, 5% Saccharose, pH 7,6) aufgenommen und die enthaltenen Bakterien durch insgesamt fünfmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff, Auftauen und Ultraschallbehandlung (auf Eis, Mikrotip, pulsed, 40% duty cycle, output 6, Sonifier cell disrupter B15, Fa. Branson, Danbury, USA) aufgeschlossen. Anschließend wurden die noch vorhandenen Zelltrümmer bei 15 000xg und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Das verbleibende Lysat wurde mit Lysis-Puffer verdünnt und eine Stunde bei 54000 rpm und 4°C (Ultrazentrifuge, Festwinkelrotor Type 60Ti c, Fa. Beckman Coulter) abzentrifugiert. Die sich dabei absetzende Gesamtmembran wurde zur Trennung von innerer und äußerer Membran mit 1% Sarkosyl (N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz, Fa. SERVA Elektrophoresis, Heidelberg) in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich 1 h bei 50 000 rpm bei 4°C (Ultrazentrifuge, Festwinkelrotor Type 60Ti c, Fa. Beckman Coulter) zentrifugiert. Der die innere Membran enthaltende Überstand wurde gesammelt und insgesamt dreimal mit Amicon Ultra-15 (Fa. Millipore Corporation, Bedford, USA) in 10 mM HEPES-Puffer ankonzentriert. Die als Pellet vorliegende äußere Membran wurde zunächst mit 0,5% Sarkosyl in 10 mM HEPES (pH 7,4), dann nochmals mit 10 mM HEPES (pH 7,4) ohne Sarkosyl gewaschen und schließlich in 10 mM HEPES resuspendiert.

Der Proteingehalt der Suspensionen aus innerer bzw. äußerer Membran wurde mit Hilfe des Coomassie Protein Assay Reagent Kits, Fa. Pierce, Rockford, USA, bestimmt.

Die Aufreinigung und Auftrennung der inneren und äußeren Membranproteine erfolgte im Wesentlichen durch Karin Oberle.

3.2.5 Aufreinigung der genomischen DNA von Bartonellen

Die Gewinnung der für Polymerasekettenreaktionen benötigten geringen Mengen genomischer DNA von Bartonellen, die mit Hilfe einer sterilen Einmal-Impfschlinge (Fa. Nunc, Wiesbaden) von Agarplatten geerntet wurden, erfolgte mittels QIAamp DNA Mini Kit (Fa. Quiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers.

Die zur Stimulation von Zellen notwendigen großen Mengen genomischer DNA wurden wie folgt aufgereinigt: von Agarplatten geerntete Bartonellen wurden einmal in PBS gewaschen (10 min, 4000xg, Raumtemperatur) und in TE-Puffer mit 0,5 % Sodiumdodecylsulfat (SDS, Fa. Merck, Darmstadt) aufgenommen. Angeschlossen wurde ein Verdau mit Proteinase K (Fa. Boehringer Mannheim) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml für 1 Stunde bei 37°C. Nach dem Durchmischen mit Natriumchlorid-Lösung (5 M, Endkonzentration 1 M) wurde zum selektiven Ausfällen von Zellwandbestandteilen, Polysacchariden und unverdauten

Proteinresten Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) hinzugefügt und für 20 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur leicht schüttelnd inkubiert. Die so ausgefallenen CTAB-Protein-bzw. Polysaccharid-Komplexe wurden in die Interphase abzentrifugiert (10 min, 6000xg, Raumtemperatur), die wässrige Oberphase in ein neues Gefäß überführt und zwei weitere Male durch Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gereinigt. Danach wurde der Überstand zwei Mal mit gleichem Volumen einer Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (24:1) versetzt, wie oben inkubiert, abzentrifugiert und in ein neues Gefäß überführt. Zu diesem Überstand wurden zur Ausfällung der DNA Isopropanol gegeben und die DNA als Faden vorsichtig durch Rühren um eine Pasteurpipette gewickelt. Dieser Faden wurde in 1ml Ethanol (70%ig) aufgenommen, 5 min bei 2000xg abzentrifugiert, getrocknet und schließlich in BE-Puffer (Fa. Macherey-Nagel, Düren) bei 4°C gelagert.

Einige Tage nach der Aufreinigung wurde die Konzentration der DNA photometrisch (Ultraspec 2100 *pro*, Fa. Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) bei 260 nm in TE-Puffer bestimmt und deren Reinheit anhand des Verhältnisses der Absorptionen bei 260 nm zu 280 nm ermittelt. Als ausreichend rein wurden DNA-Präparationen mit einem 260/280nm-Absorptionsverhältnis zwischen 1,7 und 1,9 angesehen.

3.2.6 Charakterisierung der *B. henselae*-Primärisolate

Die in Tabelle 2 (S. 26) aufgeführten Stämme wurden anhand ihrer Koloniemorphologie, ihres Genotyps (I oder II), verschiedener DNA-*Fingerprint*-Methoden und der Expression des BadA-Proteins charakterisiert.

3.2.6.1 Koloniemorphologie

Das Wachstumsverhalten der verschiedenen Bartonellen-Stämme wurde in Abhängigkeit von der Anzahl der *in vitro*-Kulturpassagen (mindestens 25 Passagen) beurteilt. Berücksichtigte Kriterien waren das Auftreten sichtbarer Kolonien als Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit (sichtbare Kolonien innerhalb von 5 Tagen: schnelles Wachstum; sichtbare Kolonien erst ab dem sechsten Tag: langsames Wachstum), das trockene, raue oder cremig-glatte Erscheinungsbild der Kolonien sowie deren Festhaften im Nährboden.

3.2.6.2 Bestimmung des Genotyps, DNA-Fingerprint-Techniken und Nachweis des virB4-Gens

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR): Eine PCR bietet die Möglichkeit, definierte DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Alle PCRs zur Charakterisierung der *B. henselae*-Isolate wurden jeweils in 50 µl-Ansätzen in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf, Hamburg) in einem Thermocycler (cyclone gradient, Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Dazu verwendete Reagenzien sind in Tabelle 4 aufgelistet. Als Negativkontrollen dienten komplette PCR-Reaktionsgemische ohne die Zugabe von DNA, als Positivkontrolle DNA der bereits von Sander et al. (217) charakterisierten Stämme Fr96/K2 - K6 und Fr97/K7 sowie des Referenzstamms ATCC 49882.

Tabelle 4: Materialien zur Durchführung der PCRs

Reagenz (Konzentration)	Bezugsquelle
Aqua ad injectabilia (Aq. ad inj.)	Fa. DeltaSelect, Pfullingen
10x Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris-HCl)	Fa. Amersham Biosciences
Deoxynucleosidtriphosphat (dNTPs, je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fa. Amersham Biosciences
Taq DNA-Polymerase (5000 Units/ml)	Fa. Amersham Biosciences
MgCl ₂ (25 mM)	Fa. Amersham Biosciences
Bovines Serum Albumin (BSA, 100 µg/ml),	Fa. Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Merck, Darmstadt

Auftrennung und Detektion der PCR-Produkte: Die Auftrennung der PCR-Amplifikationsprodukte erfolgte elektrophoretisch mit 0,5x TBE-Puffer in horizontalen, je nach Größe des erwarteten PCR-Produkts 1,0 - 2,5%igen Agarose-Flachbettgelen (peqGOLD Universal Agarose, Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen), denen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Fa. Sigma, Deisenhofen) zugegeben wurde. Je Zentimeter Elektrodenabstand wurde eine Spannung von ca. 5 V für 45 - 90 min angelegt.

Von jedem PCR-Ansatz wurden 20 µl Amplifikat zusammen mit 2 µl Gelladungspuffer aufgetragen. Je nach Größe der erwarteten Amplifikate wurde als Molekulargewichtsmarker entweder „ΦX174 RF DNA *Hinc* II“ (Fa. ABgene, Surrey, UK) oder „100 bp DNA Ladder“ (Fa. GIBCO BRL, Karlsruhe) verwendet.

Die DNA-Fragmente wurden nach ihrer Auftrennung unter UV-Licht (312 nm, UVT-20 M/W, Fa. Herolab GmbH, Wiesloch) durch das in Nukleinsäuren interkalierende

Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Fragmentgrößen wurden im Vergleich mit dem Standard bestimmt.

Amplifikation Bartonellen-spezifischer DNA: Die Überprüfung der DNA-Präparation erfolgte über den Nachweis Bartonellen-spezifischer DNA. Hierzu wurden 2 ng DNA eines jeden Isolats mit dem von Relman et al. (205) beschriebenen Primerpaar p24E und p12B (je 117 nM) in Aq. ad inj. mit 10x Puffer, je 200 µM der dNTPs, 8 µg/ml BSA, und 2 Units Taq DNA-Polymerase versetzt und ein 298 bp großes Fragment des 16S rRNA Gens in einer PCR amplifiziert (Sequenz der Primer und Temperatur-Zeit-Protokoll siehe Tabelle 5 und 6).

Tabelle 5: Primer zur Amplifikation des Bartonellen-16S rRNA Gens

Bezeichnung	Ziel-organismen	Sequenz	Länge des Amplifikats	Bezugsquelle
p24E	<i>Bartonellaceae</i>	5'-CCTCCTTCAGTTAGGCTGG-3'	298 bp	Fa. Birsner & Grob-Biotech, Denzlingen
p12B		5'-GAGATGGCTTTTGGAGATTA-3'		Fa. Birsner & Grob-Biotech, Denzlingen

Tabelle 6: Temperatur-Zeit-Protokoll zur Amplifikation des Bartonellen-16S rRNA Gens

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94°C	3 min
2	30	94°C	1 min
		57°C	1 min
		72°C	1 min
3	1	72°C	10 min
4	1	4°C	∞

Bestimmung des Genotyps: Zur Unterscheidung zwischen Genotyp I und II wurden je 10 ng DNA mit den von Bergmans et al. (22) beschriebenen Primerpaaren (16SF und BH1 bzw. 16SF und BH2, je 400 nM, siehe Tabelle 7) in Aq. ad. inj., 10x Puffer und mit je 200 µM der dNTPs, 8 µg/ml BSA und 2 Units Taq DNA-Polymerase versetzt und in zwei separaten PCRs nach dem in Tabelle 8 angegebenen Schema amplifiziert.

Tabelle 7: Primer zur Unterscheidung von Genotyp I und II

Bezeichnung	Ziel-organismus	Sequenz	Länge des Amplifikats	Bezugsquelle
16SF	Eubakterien	5'-AGAGTTTGATCCTGG(CT)TCAG-3'		Fa. Birsner & Grob-Biotech, Denzlingen
BH1	<i>B. henselae</i> Genotyp I	5'-CCGATAAATCTTTCTCCCTAA-3'	185 bp	Fa. Birsner & Grob-Biotech, Denzlingen
BH2	<i>B. henselae</i> Genotyp II	5'-CCGATAAATCTTTCTCCAAAT-3'	185 bp	Fa. Birsner & Grob-Biotech, Denzlingen

Tabelle 8: Temperatur-Zeit-Protokoll der PCR zur Unterscheidung von Genotyp I und II

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	3 min
2	30	95°C	20 s
		57°C	30 s
		72°C	1 min
3	1	72°C	5 min
4	1	4°C	∞

Arbitrarily Primed-PCR (AP-PCR) mit M13 Primer: Dieser Methode liegt eine stammspezifische Verteilung des Bakteriophagen M13 im bakteriellen Genom zugrunde. Eine Amplifikation bakterieller DNA mit Hilfe eines Primers für die Kernsequenz dieses Bakteriophagen (M13 Primer, siehe Tabelle 9) führt so zu einem stammspezifischen Bandenmuster (98, 217). In der vorgelegten Arbeit wurden 100 ng DNA eines jeden Isolats in Aq. ad inj. mit 10x Puffer, je 200 µM der dNTPs, 8 µg/ml BSA, 250 nM M13 Primer und 2 Units Taq DNA-Polymerase versetzt und bei einer Heizrate von 25°C/min nach dem in Tabelle 10 angegebenen Temperaturschema amplifiziert.

Tabelle 9: M13 Primer für AP-PCR

Bezeichnung	Ziel-organismus	Sequenz	Bezugsquelle
M13	Bakteriophage M13	5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'	Fa. Birsner & Grob-Biotech, Denzlingen

Tabelle 10: Temperatur-Zeit-Protokoll der AP-PCR

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94°C	5 min
2	4	94°C	30 s
		43°C	2 min
		72°C	2 min
3	30	94°C	20 min
		50°C	1 min
		72°C	30 s
4	1	72°C	5 min
5	1	4°C	∞

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR): Eine Typisierung verschiedener Bakterienstämme ist anhand sich wiederholender DNA-Sequenzen im eubakteriellen Genom möglich. Die in einer hierzu durchgeführten ERIC-PCR verwendeten Primer (siehe Tabelle 11) binden an 126 bp lange, extragenetisch lokalisierte DNA-Abschnitte, deren Sequenz hoch konserviert, deren Verteilung innerhalb des Genoms jedoch

stammspezifisch ist und somit zu in Anzahl und Länge ebenfalls stammspezifischen PCR-Produkten führen (217, 250). In der vorgelegten Arbeit wurden 100 ng DNA eines jeden Isolats in Aq. ad inj. mit 10x Puffer, je 200 µM der dNTPs, 8 µg/ml BSA, 50 nM des Primers ERIC 1R, 50 nM des Primers ERIC 2R und 2 Units Taq DNA-Polymerase versetzt und bei einer Heizrate von 25°C/min nach dem in Tabelle 12 angegeben Temperaturschema amplifiziert.

Tabelle 11: Primer für ERIC-PCR

Bezeichnung	Ziel-organismus	Sequenz	Bezugsquelle
ERIC 1R	Eubakterien	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC -3'	Fa. Birsner&Grob-Biotech, Denzlingen
ERIC 2R	Eubakterien	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGAGCG-3'	Fa. Birsner&Grob-Biotech, Denzlingen

Tabelle 12: Temperatur-Zeit-Protokoll der ERIC-PCR

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94°C	7 min
2	30	94°C	1 min
		40°C	1 min
		65°C	8 min
3	1	65°C	16 min
4	1	4°C	∞

Repetitive Extragenic Palindromic-PCR (REP-PCR): Ergänzend zur ERIC-PCR ist eine weitere Typisierung von Bakterienstämmen anhand sich wiederholender palindromer DNA-Sequenzen im eubakteriellen Genom mittels einer sog. REP-PCR möglich. Die hierbei verwendeten Primer (siehe Tabelle 13) binden an 38 bp lange, nicht-kodierende DNA-Abschnitte, deren Sequenz hoch konserviert ist, deren Verteilung innerhalb des Genoms jedoch stammspezifisch ist und die somit zu einer stammabhängigen Anzahl und Länge von PCR-Produkten führen (217, 250).

In der vorgelegten Arbeit wurden 100 ng DNA eines jeden Isolats in Aq. ad inj. mit 10x Puffer, je 200 µM der dNTPs, 8 µg/ml BSA, 5% DMSO, 50 nM des Primers Rep1R-Dt, 50 nM des Primers Rep2-D und 2 Units Taq DNA-Polymerase versetzt und bei einer Heizrate von 25°C/min nach dem in Tabelle 14 angegeben Temperaturschema amplifiziert.

Tabelle 13: Primer für REP-PCR

Bezeichnung	Ziel-organismus	Sequenz	Bezugsquelle
Rep1R-Dt	Eubakterien	5'- (AGCT)CG(AGCT)CG(AGCT)CATC(AGCT)GGC -3'	Fa. Birsner&Grob-Biotech, Denzlingen
Rep2-D	Eubakterien	5'-(GA)CG(CT)CTTA-TC(CA)GGCCTAC-3'	Fa. Birsner&Grob-Biotech, Denzlingen

Tabelle 14 Temperatur-Zeit-Protokoll der REP-PCR

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	7 min
2	30	90°C	30 s
		43°C	1 min
		65°C	1 min
3	1	65°C	16 min
4	1	4°C	∞

Nachweis von virB4¹⁴⁶⁻²⁵⁶, virB4²³⁷⁻³⁵⁷ und virB4⁴⁸⁰⁻⁵³⁷ (TypIV-Sekretionssystem): Zum Nachweis des virB4-Gens von *B. henselae*, welches für eine Untereinheit eines Typ IV-Sekretionssystems und damit für einen potentiellen Virulenzfaktor kodiert, wurden jeweils 2 ng DNA jedes *B. henselae*-Stammes sowie als Negativkontrolle DNA von *B. elizabethae* in drei verschiedenen Ansätzen mit je 200 nM der von Woestyn et al. (259) beschriebenen Primerpaare MBLG133 und MBLG134 bzw. MBLG135 und MBLG136 bzw. MBLG137 und MBLG138 (siehe Tabelle 15) in Aq. ad inj. mit 10x Puffer, je 200 µM der dNTPs und 1,2 Units Taq DNA-Polymerase versetzt und drei Abschnitte des virB4-Gens nach den in den Tabellen 16 und 17 angegebenen Temperaturschemata amplifiziert.

Tabelle 15: Primer für die Amplifikation von virB4¹⁴⁶⁻²⁵⁶, virB4²³⁷⁻³⁵⁷ und virB4⁴⁸⁰⁻⁵³⁷

Ziel-organismus	Bezeichnung	Sequenz	Amplifikat (Länge)	Bezugsquelle
<i>B. henselae</i>	MBLG133	5'-CCATCAGTCATCCCTGGTCGG-3'	codon 146 - 256 (331 bp)	Fa. MWG Biotech, Ebersberg
	MBLG134	5'-CTGAACCCGATCAGGAAGCCA-3'		Fa. MWG Biotech, Ebersberg
	MBLG135	5'-AAATCTTCTCTCGCGATAACG-3'	codon 273 - 357 (254 bp)	Fa. MWG Biotech, Ebersberg
	MBLG136	5'-AAGAGTAAAGCAGCGGCTAGT-3'		Fa. MWG Biotech, Ebersberg
	MBLG137	5'-TCCCAAGGCATCAATGGCTTT-3'	codon 480 - 537 (174 bp)	Fa. MWG Biotech, Ebersberg
	MBLG138	5'-AAGCCTTTGAAAAATGGACAA-3'		Fa. MWG Biotech, Ebersberg

Tabelle 16: Temperatur-Zeit-Protokoll für die Amplifikation von virB4¹⁴⁶⁻²⁵⁶

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94°C	3 min
2	30	94°C	1 min
		57°C	1 min

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
		72°C	10 min
3	1	72°C	10 min
4	1	4°C	∞

Tabelle 17: Temperatur-Zeit-Protokoll für die Amplifikation von virB4²³⁷⁻³⁵⁷ und virB4⁴⁸⁰⁻⁵³⁷

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94°C	3 min
2	30	94°C	1 min
		60°C	1 min
		72°C	10 min
3	1	72°C	10 min
4	1	4°C	∞

3.2.6.3. Western-Immunoblot zum Nachweis von Bartonella Adhesin A (BadA)

Zum Nachweis der Expression von BadA, einem 340 kDa großen äußeren Membranprotein von *B. henselae*, dem eine wichtige Rolle hinsichtlich der Infektiosität der Bakterien zugeschrieben wird (208), wurde ein Western-Immunoblot durchgeführt. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, einzelne Proteine durch spezifische Antikörper in einem komplexen Proteingemisch nachzuweisen.

Hierzu wurden die *B. henselae*-Stämme nach vier Tagen Kultivierung auf Hämatinagar in PBS eingerührt und der Gesamtproteingehalt der Proben mit Hilfe des Coomassie Protein Assay Reagent Kits nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Auftrennung des Proteingemischs erfolgte durch eine SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (144). Je 2,5 µg Protein jedes Stammes wurde hierzu nach 3 minütiger Inkubation bei 95°C in 4x Probenpuffer nach Lämmli in die Taschen eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels (Zusammensetzung siehe Tabelle 18) aufgetragen und in Laufpuffer bei einer Spannung von 150 V in Systemen der Firma Bio-Rad (München) aufgetrennt. Bei dieser Methode lagert sich SDS an die Polypeptide an, die dadurch summarisch negativ geladen und im elektrischen Feld proportional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wurde parallel ein Proteinstandard (Precision Plus Protein Standards, Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) aufgetragen.

Im Elektroblobverfahren wurden anschließend die Proteine vom Gel auf eine Trägermembran (Immobilon-P PVDF, Fa. Millipore Corporation, Bedford, USA) transferiert. Dazu wurde die Elektroblobting-Apparatur der Firma Bio-Rad (München) nach dem System von Towbin et al. (241) verwendet: Die PVDF Membran wurde durch kurzes Eintauchen in Methanol aktiviert,

dann in deionisiertem Wasser fünf Minuten gewaschen und schließlich weitere fünf Minuten mit Blottingpuffer äquilibriert. Anschließend wurde auf die Membran das Acrylamidgel blasenfrei gelegt, um einen optimalen Transfer zu gewährleisten. Zur sicheren Fixation wurden einige Lagen Filterpapier verwendet und der Rahmen schließlich vertikal in die Kammer eingespannt. Der Elektrotransfer erfolgte bei Eiskühlung für 1 Stunde mit konstant 100 V bei initial 0,3 A. Danach wurde die Membran zum Absättigen ihrer freien, unspezifischen Proteinbindungsstellen für 1 Stunde in 10%iger Magermilchlösung bei Raumtemperatur auf einen Kippschüttler gestellt. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/Tween 20 (0,05%) wurde die Membran mit dem Primärantikörper (Serum eines mit BadA immunisierten Kaninchens [erhalten von PD Dr. V. J. Kempf, Tübingen] - 1:3000 verdünnt in 10%iger Magermilchlösung) für eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren halbstündigen Waschschrift mit PBS/Tween 20 (0,05%) wurde ein mit Alkalischer Phosphatase konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG Sekundärantikörper (F(ab')₂-Fragment, Fa. Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:5000 in 10%iger Magermilchlösung hinzugegeben und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde noch einmal wie oben gewaschen und die gebundenen Antikörper durch Zugabe einer Substratlösung (BCIP/NBT Substrattablette, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) sichtbar gemacht. Die Reaktion wurde nach 6 - 8 min mit Wasser abgestoppt und das Bandenmuster nach dem Trocknen der Membran beurteilt.

Die Proteinauftragsmenge wurde anhand eines mit Amidoschwarz gefärbten Parallelansatzes nach dem Transfer kontrolliert und gegebenenfalls angepasst. Die Membran wurde hierzu 5 min in Amidoschwarzfärbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung entwickelt.

Tabelle 18: Zusammensetzung eines 12%igen Acrylamidgels

Trenngel:	
40,0% (v/v)	30%iges Acrylamid (Rotiphorese Gel 30, Fa. Roth, Karlsruhe)
25,0% (v/v)	4x Trenngelpuffer
1,0% (v/v)	10%iges SDS
33,42% (v/v)	Aqua dest.
0,5% (v/v)	10%iges Ammoniumpersulfat (APS)
0,08% (v/v)	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)
Sammelgel:	
13,3% (v/v)	30%iges Acrylamid (Rotiphorese Gel 30, Fa. Roth, Karlsruhe)
25,0% (v/v)	4x Sammelgelpuffer
1,0% (v/v)	10%iges SDS
59,94% (v/v)	Aqua dest.
0,5% (v/v)	10%iges Ammoniumpersulfat (APS)
0,26% (v/v)	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

3.2.7 Durchführung der Mausinfektionsversuche

3.2.7.1 Inokulation der Bartonellen

Je 20 µl der lebenden bzw. inaktivierten Bartonellen (siehe Kapitel 3.2.2 - 3.2.3) wurde den durch Inhalation von Isofluran (Forene[®], Fa. Abbott, Wiesbaden) sedierten Mäusen s.c. am Pfotenrücken der Hintergliedmaße mit Hilfe einer 1 ml-Einmalspritze („1 ml Sub-Q“ 26G ½, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) injiziert. Als Negativkontrolle wurde sterilfiltriertes, LPS-freies PBS verwendet.

3.2.7.2 Sektion der Mäuse und Probennahme

Die mit Bartonellen inokulierten Mäuse wurden je nach Versuch zu definierten Zeitpunkten in CO₂-Narkose durch Luxation der Halswirbelsäule getötet. Bei der anschließenden Probennahme wurde für jedes Organ eigenes, sterilisiertes Besteck verwendet, um ein Verschleppen von Bakterien oder DNA ausschließen zu können.

Zur Entnahme von Blut wurde nach Desinfektion des Tierkörpers mit 70%igem Ethanol der Brustkorb eröffnet und durch Punktion der rechten Herzkammer Blut entnommen. Dieses wurde aufgeteilt auf ein Probengefäß mit vorgelegtem EDTA (Probengefäß 1,3 ml K3E, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) und einen Microtainer[®] SST (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) zur Gewinnung von Serum.

Von Milz und Leber wurden wie folgt Proben genommen: Zum Anlegen von Kulturen wurden mind. 1/3 Milz bzw. 1 Leberlappen in sterilem PBS oder Flüssigmedium für Bartonellen aufgenommen; zum Nachweis von DNA wurden mind. 1/3 Milz bzw. 1 Leberlappen direkt in sterile Reaktionsgefäße gegeben oder später aus bereits für die Kultivierung homogenisierten Proben entnommen und bei -20°C eingefroren.

Die inguinalen und poplitealen Lymphknoten wurden beidseits entnommen, auf einer Feinwaage (SCALTEC[®] SBC32, Fa. Scaltex Instruments, Brentwood USA) gewogen und entweder zur Zellzahlbestimmung, zum Anlegen einer Kultur, zum Nachweis von DNA oder zur Durchflusszytometrie wie später beschrieben homogenisiert oder aber für spätere histologische Untersuchungen mit Tissue Tek[®] (Fa. Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) überschichtet, in 1,8 ml Cryo tubeTM-Gefäßen (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

Für einige Versuche wurden die brachialen Lymphknoten für eine durchflusszytometrische Untersuchung entnommen.

Die Pfoten der Hintergliedmaßen wurden nach Desinfektion mit 70%igem Ethanol an den Injektionsstellen punktiert und mit ~50 µl Flüssigmedium für Bartonellen gespült. Von der zurückgewonnenen Spülflüssigkeit wurde eine Kultur angelegt.

Zur Gewinnung von Knochenmark wurde wie in Kapitel 3.2.12.1 beschrieben ein Unterschenkel entnommen, mit sterilem PBS gespült und das gesamte gewonnene Material für die Kultur verwendet.

3.2.7.3 Anlegen und Auswerten von Kulturen aus Mausgewebeproben

Die für die Anzucht von Bartonellen gewonnenen Proben wurden zeitnah unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank (HeraSafe, Fa. Heraeus, Hanau) weiterbearbeitet.

Milz, Leber und Lymphknoten wurden mit einem gummierten Spritzenstempel einer 10 ml - Spritze (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen), durch ein Zellsieb (100 µm, Falcon, Fa. BD Biosciences, Heidelberg) unter Zugabe von sterilem PBS oder Flüssigmedium für Bartonellen homogenisiert. Das dabei gewonnene Material wurde auf drei Agarplatten verteilt und gleichmäßig ausgestrichen. Wurde aus demselben Lymphknoten sowohl eine Kultur angelegt als auch ein Anteil für den Nachweis von DNA abgenommen, wurde das homogenisierte Material zu gleichen Teilen auf beide Methoden verteilt. Proben aus Milz und Leber wurden vor dem Homogenisieren gewogen (1608 MP, Fa. Sartorius, Göttingen), um die Keimzahl pro Gewichtseinheit bestimmen zu können.

EDTA-Blut (je 75 – 100 µl) und Knochenmark wurden ebenfalls auf drei Agarplatten, die an der Injektionsstelle gewonnene Spülflüssigkeit auf einer Agarplatte ausgestrichen.

Die so angelegten Kulturen wurden unter den in Kapitel 3.2.1. genannten Bedingungen, gegebenenfalls mit Amme, für 21 Tage inkubiert. Repräsentative Kolonien mit Bartonellen-ähnlicher Morphologie und langsamen Wachstum wurden auf einem Objektträger ausgestrichen, durch kurzes Abflammen am Bunsenbrenner hitzefixiert und eine Färbung nach Gram (Mirastainer™, Fa. EMD Chemicals) angefertigt. Handelte es sich um kleine, pleomorphe Gram-negative Stäbchen, wurden die entsprechenden Kolonien ausgezählt.

3.2.7.4 Bestimmung der Zellzahl je Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden wie im vorausgehenden Kapitel beschrieben durch ein Zellsieb homogenisiert und die Zellen in einem definierten Volumen aufgenommen. Die Gesamtzellzahl je Lymphknoten wurde nach dem Verdünnen eines Aliquots mit 0,5%iger

(w/v) Trypanblaulösung (Fa. Merck, Darmstadt) durch das Auszählen aller lebenden (ungefärbten) und toten (blauen) Zellen in einer Kammer nach Neubauer nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl / Lymphknoten} = N \times D \times 10^4 \times V$$

N = Anzahl der Zellen in 16 Gruppenquadraten

D = Faktor der Verdünnung mit Trypanblaulösung

V = Volumen, in welchem die Zellen aufgenommen wurden [in ml]

3.2.7.5 Nachweis Bartonellen-spezifischer DNA aus Mausgewebe

Nach s.c. Injektion von Bartonellen wurde aus den drainierenden poplitealen und inguinalen Lymphknoten sowie aus Milz, Leber und EDTA-Blut der Mäuse die DNA mit dem Kit „NucleoSpin® Tissue“ (Fa. Macherey-Nagel, Düren) nach Vorschrift des Herstellers aufgearbeitet. Um eine möglichst gute Ausbeute zu erhalten, wurde die DNA zweimal in insgesamt 200 µl BE-Puffer des Kits eluiert.

Der Nachweis Bartonellen-spezifischer DNA aus diesen Proben erfolgte durch die Amplifikation eines 195 bp langen Fragments des Riboflavin C-Gens von *B. henselae*, *B. quintana*, *B. grahamii* und einigen anderen *Bartonella*-Spezies in einer quantitativen real-time PCR. Diese Methode ermöglicht u.a. die Detektion einer spezifischen Amplifikation bereits während der ablaufenden PCR durch die Freisetzung eines Fluoreszenzfarbstoffs von einer in der Zielsequenz bindenden Sonde. Je 2 µl der aufgearbeiteten DNA wurden hierzu als Dupletts in insgesamt 20 µl-Ansätzen mit Quantitect Probe PCR Master Mix (Fa. Quiagen, Hilden), je 0,5 µM der Primer LC-RibC-F und LCN-RibC-R sowie 0,2 µM RibC-Sonde versetzt und in Glaskapillaren (LightCycler Capillaries, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) mit Hilfe eines LightCycler (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) nach dem in Tabelle 19 angegebenen Programm amplifiziert. Die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs 6-FAM vom 5'-Ende der Sonde während der Amplifikation der Zielsequenz wurde vom LightCycler gemessen, mit der zugehörigen Software (Version 3.5) mit der „Fit Point“-Methode ausgewertet und ein C_T-Wert < 45 in beiden Ansätzen als positiver Nachweis von *Bartonella*-DNA gewertet. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein das RiboflavinC-Gen von *B. henselae* ATCC 49882 kodierendes Plasmid, als Negativkontrolle ein Ansatz ohne DNA mitgeführt (C_T-Wert = threshold cycle = Zykluszahl, ab der die durch den Zerfall der Sonde während einer spezifischen Amplifikation freigesetzte Fluoreszenz messbar wird).

Tabelle 19: Primer und Sonde für den Nachweis des RibC-Gens im LightCycler

Ziel-organismus	Zielgen	Bezeichnung	Sequenz	Amplifikat (Länge)	Bezugsquelle
<i>B. henselae</i> , <i>B. grahamii</i> , <i>B. quintana</i> und einige andere Bartonellen	Rib C	Primer			
		LC-RibC-F	5'- GGTGCATCAATTGCGTGTT CA-3'	195 bp	Fa. MWG Biotech, Ebersberg
		LCN-RibC-R	5'- ATGCCCACCCATTTTCATCA CC -3'		Fa. MWG Biotech, Ebersberg
		Sonde			
		RibC-Sonde	6-FAM 5'- TTGGTTTGCTGTAGAAGCG TGGGAAGA -3' TAMRA		Fa. MWG Biotech, Ebersberg

Tabelle 20: Temperatur-Zeit-Protokoll für den Nachweis des RibC-Gens im LightCycler

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	15 min
2	50	95°C	15 s
		58°C	1 min
3	1	40°C	30 s

3.2.7.6 Nachweis Bartonellen-spezifischer Antikörper (IgG) im Serum

Das in Microtainer[®] SST (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) gesammelte Blut ruhte nach der Abnahme für 1 Stunde bei Raumtemperatur, um eine möglichst vollständig ablaufende Gerinnung zu ermöglichen. Das Serum wurde anschließend bei 6000xg für 2 min abzentrifugiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zum quantitativen Nachweis von Bartonellen-spezifischem Immunglobulin G (IgG) im Serum wurde der auch in der humanmedizinischen Routinediagnostik der KKK eingesetzte indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) durchgeführt. Der rein qualitative Nachweis erfolgte über Western-Immunoblot.

Immunfluoreszenztest:

Auf die Auftragsstellen eines Test-Objektträgers (Biognost[®] Bartonella henselae Objektträger in Hep2 Zellen, Fa. Bios GmbH, München) wurden je 20 µl in zweier Verdünnungsschritten von 1:64 bis 1:1024 vorverdünntes Serum aufgetragen. Die darin enthaltenen, spezifischen Antikörper haben so die Gelegenheit, an auf den Objektträgern intrazellulär vorliegende *B. henselae* zu binden. Als Negativkontrolle wurde das Serum einer nicht mit Bartonellen infizierten Maus in einer Verdünnung von 1:64, als Positivkontrolle ein bereits positiv getestetes Mausserum in einer Verdünnung von 1:512 aufgetragen. Die Seren wurden auf den

Objektträgern für 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie zunächst vorsichtig von den Auftragsstellen abgewaschen und anschließend verbliebene freie Antikörper durch 2 x 5 min Waschen des gesamten Objektträgers in PBS entfernt. Wiederum in einer feuchten Kammer wurden dann zur Detektion der gebundenen, *B. henselae*-spezifischen Antikörper je 10 µl eines 1:100 vorverdünnten, FITC-konjugierten Ziege-Anti-Maus-IgG (H+L)-Antikörpers (F(ab')₂ Fragment, Fa. Dianova, Hamburg) aufgetragen und 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloss sich nochmals ein wie oben beschriebener Waschschrift an, bevor der Objektträger mit Einschlussmedium (Fa. Bios GmbH, München) und einem Deckglas abgedeckt wurde.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch bei 400x Vergrößerung und Auflichtfluoreszenz (450 – 490 nm Filter, Axioskop 2 plus, epq 100, HAL100, Fa. Carl Zeiss, Jena). Als positiv wurden Verdünnungsstufen gewertet, an deren Auftragsstellen intrazelluläre Bartonellen als kleine, aber kräftig grün fluoreszierende, zytoplasmatische Stäbchen sichtbar waren. Als Endtiter wurde jeweils die letzte positive Verdünnungsstufe gewertet. Dieser Endtiter wurde durch zwei unabhängige Personen bestimmt und bei unterschiedlicher Beurteilung jeweils der niedrigere als Ergebnis festgelegt.

Western-Immunoblot zum Nachweis gegen *B. henselae* gerichteter IgG:

Der Western-Immunoblot diente dem rein qualitativen und billigeren, jedoch unspezifischeren Nachweis von gegen *B. henselae* gerichteten Antikörpern. Dieser wurde im Wesentlichen wie in Kapitel 3.2.6.3. bereits beschrieben ausgeführt. Als Antigen dienten in PBS eingerührte *B. henselae* Fr98/K8, die vor ihrer Auftrennung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 5 min durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (auf Eis, Mikrotip, pulsed, 40% duty cycle, output 6, Sonifier cell disrupter B15) und 10 min bei 95°C in 4x Probenpuffer nach Lämmli gekocht wurden. Die zu untersuchenden Mausseren wurden 1:200 verdünnt in 10%iger Magermilchlösung eingesetzt. Als Kontrollen dienten ein im IFT bereits positiv getestetes Serum, Seren nicht oder nur wenige Stunden infizierter Mäuse sowie ausschließlich der Sekundäntikörper (1:5000 verdünnter, Alkalische Phosphatase konjugierter Ziege-Anti-Maus IgG(H+L) (F(ab')₂-Fragment, Fa. Dianova, Hamburg). Die Reaktion der Substratlösung mit dem Sekundäntikörper wurde nach acht Minuten abgestoppt. Als positiver Antikörpernachweis wurde eine durch mehrere kräftige Banden sichtbar gewordene Reaktion gewertet.

3.2.8 Anfertigung von Gefrierschnitten und Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen und bei -80°C gelagerten Lymphknoten mit Tissue Tek[®] (Fa. Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) auf einen Schneideblock des Kryostats (CM 1850, Fa. Leica Microsystems, Nussloch) aufgefroren und 30 min bei -24 bis -25°C inkubiert. Anschließend wurden von mehreren Stellen des Gewebes $5\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgenommen (SuperFrost[®] Plus, Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen). Die Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in Aceton (10 min, -20°C ; Fa. Merck, Darmstadt) fixiert. Die kurz getrockneten Schnitte wurden dann mit Hämatoxylin und Eosin wie folgt gefärbt:

Die Objektträger wurden für acht Minuten in saures Hämatoxylin nach Mayer (Mayers Hämalaulösung, Fa. Merck, Darmstadt) gestellt, danach kurz mit Leitungswasser gespült und zum Differenzieren einmal in 70%iges Ethanol mit 1% Salzsäure getaucht. Nach einem 5 - 10 minütigen Waschschrift in Leitungswasser erfolgte die Gegenfärbung in wässrigem 1%igen Eosin Gelblich mit 3 - 4 Tropfen Eisessig zur Stabilisation (0,5 – 1 min; Fa. Merck, Darmstadt). Überschüssiges Eosin wurde durch einmaliges, rasches Eintauchen in deionisiertes Wasser entfernt und die Färbung in einer aufsteigenden Alkoholreihe differenziert (1 - 2x in 70% Ethanol, 1 - 2x in 96% Ethanol, 2 x 1 min in 100% Ethanol). Die Schnitte wurden nach 5 - 10 Minuten Inkubation in Roti[®]Histol (Fa. Roth, Karlsruhe) mit Roti[®]Histokitt (Fa. Roth, Karlsruhe) und Deckgläschen abgedeckt.

Die Morphologie der so geschnittenen und gefärbten Lymphknoten wurde lichtmikroskopisch (Axioskop 2 plus, Fa. Carl Zeiss, Jena) bei 100x, 200x und 400x Vergrößerung beurteilt.

3.2.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine Analyse von Zellen anhand ihrer Größe und Granulierung sowie die Messung einer Zellmarkierung mit gegen bestimmte Moleküle gerichteten, spezifischen Antikörpern, die direkt oder indirekt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. In der vorgelegten Arbeit wurden die zur Analyse bestimmten Zellen zunächst einmal in FACS-Puffer gewaschen ($300\times g$, 4°C , 10 min) und freie Fc-Rezeptoren vor dem eigentlichen Färben durch Inkubation der Zellen (3 – 5 min bei Raumtemperatur) mit Ratte anti-Maus Fc γ Rezeptor Typ II/III-Antikörper („Fc-Block“; Zellkulturüberstand des Rattenhybridoms 2.4 G2; erhalten von der Abteilung Immunologie, Institut für Medizinische

Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg) blockiert. Für jede Färbung wurden dann maximal 1×10^6 Zellen in 100 μl Volumen mit den jeweiligen, gegen Zelloberflächenmoleküle der Maus gerichteten Antikörpern (siehe Tabelle 21) in FACS-Puffer für 20 – 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Bei Antikörpern, die nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sondern biotinyliert waren, schloss sich ein weiterer Färbeschritt mit Streptavidin-APC, -PE oder PerCP (Streptavidin-PE 1:1000, Streptavidin-APC 1:500, Streptavidin-PerCP 1:100 verdünnt; Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) an. Freie Antikörper wurden nach jedem Inkubationsschritt herausgewaschen. Bis zur Messung wurden die spezifisch oberflächengefärbten Zellen bei 4°C in FACS-Puffer aufbewahrt. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurde kurz vor der Analyse Propidiumjodid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration; Fa. Sigma), das nur in toten Zellen zur Anfärbung des Zellkerns führt, hinzugegeben (Propidiumjodid wurde nicht verwendet bei der Färbung fixierter oder bereits CFSE-markierter Zellen).

Zur anschließenden durchflusszytometrischen Messung wurde ein Gerät des Typs FACS Calibur, Fa. BD Biosciences Heidelberg benutzt. Die Einstellung und Kompensation der Laser erfolgte für jeden Versuch anhand von Einzelfärbungen mit den verwendeten Antikörpern, wurden in Form eines Standardprotokolls gespeichert und für alle folgenden Messungen verwendet. Die Granularität (sideward scatter) und Größe (forward scatter) der Zellen und ggf. die Propidiumjodidfärbung dienten zur Festlegung eines Auswertefensters, das nur lebende Zellen enthielt. Insgesamt wurden je Messung 10.000 – 500.000 lebende Zellen aufgenommen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Cell Quest™ Pro Version 4.0.2..

Tabelle 21: zur Durchflußzytometrie verwendete Antikörper

Spezifität	Konjugation	Isotyp	Klon	Endverdünnung	Bezugsquelle
Ratte-anti-Maus CD4	FITC	IgG _{2b} , κ	GK1.5	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-Maus NK-1.1.	FITC	IgG _{2a} , κ	PK136	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD11b	FITC	IgG _{2b} , κ	M1/70	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD49b/Pan-NK Cells	FITC	IgM, κ	DX5	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD45/B220	FITC	IgG _{2a} , κ	RA3-6B2	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD8a	FITC	IgG _{2b}	5H10	1:100	Fa. Caltag Laboratories, Hamburg
Hamster-anti-Maus CD3 ϵ	PE	IgG1, κ	145-2C11	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD45/B220	PE	IgG _{2a} , κ	RA3-6B2	1:500	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

Spezifität	Konjugation	Isotyp	Klon	Endverdünnung	Bezugsquelle
Hamster-anti-Maus CD69	PE	IgG1, 13	H1.2F3	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Hamster-anti-Maus CD11c	PE	IgG1, 12	HL3	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD4	PE	IgG2 _a	RM4-5	1:200	Fa. Caltag Laboratories, Hamburg
Maus-anti-Maus NK-1.1.	PE	IgG2 _a , κ	PK136	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus I-A/I-E	PE	IgG2 _b , κ	M5/114 .15.2	1:2000	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD40	PE	IgG2 _a , κ	3/23	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD8a	Cyanine 5	IgG2 _b	5H10	1:500	Fa. Caltag Laboratories, Hamburg
Ratte-anti-Maus CD8a	APC	IgG2 _b	5H10	1:100	Fa. Caltag Laboratories, Hamburg
Ratte-anti-Maus Ly-6G (GR1) und Ly-6C	APC	IgG2 _b , κ	RB6-8C5	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Hamster-anti-Maus CD3ε	APC	IgG1, κ	145-2C11	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Hamster-anti-Maus CD11c	APC	IgG1, 12	HL3	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD62L	APC	IgG2 _a , κ	MEL-14		Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD19	Biotin	IgG2 _a , κ	1D3	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD4	Biotin	IgG2 _a , κ	RM4-5	1:1000	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Hamster-anti-Maus CD80	Biotin	IgG2 _b , κ	16-10A1	1:500	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-anti-Maus CD86	Biotin	IgG2 _a , κ	GL1	1:500	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-BrdU	APC			1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Isotypenkontrollen:					
Isotyp-Kontrolle Ratte	FITC	IgG2 _a , κ	R35-95	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle Ratte	PE	IgG1, κ	A110-1	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle Ratte	APC	IgG1, κ	R3-34	1:100	Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

FITC: Fluoresceinisothiocyanat PE: Phycoerythrin APC: Allophycocyanin PerCP: Peridinin-chlorophyllprotein

3.2.10 Untersuchung der Zellproliferation *in vivo*

Um am lebenden Tier eine Proliferation von Zellen nachweisen zu können, wurde Mäusen über das Trinkwasser 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU; 0,8 mg/ml, bei Lichtschutz, alle 1,5 Tage frisch angesetzt; Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) verabreicht. BrdU wird als Thymidinanalog während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut und kann schließlich über einen spezifischen Antikörper detektiert werden (261). Nach s.c. Inokulation

von *B. henselae* FR98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 bzw. nach Injektion von 20 μ l PBS (Negativkontrolle) in den Rücken der linken Hinterpfote wurde den Mäusen ab Tag 14 p.i. bis Versuchsende ausschließlich BrdU-haltiges Trinkwasser angeboten. Als Positivkontrolle wurden ein Tag nach Beginn der BrdU-Gabe bisher uninfizierte Tiere mit Lymphozytärem Choriomeningitis Virus (LCMV; Stamm LCMV-WE, erhalten von der Abteilung Immunologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg) i.v. und s.c. in den den Rücken beider Hinterpfoten (200 pfu bzw. je 30 pfu) infiziert. Eine Infektion mit LCMV ruft insbesondere eine Proliferation von CD8⁺ Zellen hervor (180). Zwischen Tag 21 und Tag 26 nach Versuchsbeginn wurden aus mehreren Mäusen beide poplitealen Lymphknoten entnommen und vereint. Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl je Gruppe wurden die Zellen für die Oberflächenmoleküle CD3, CD19, CD4 und CD8 gefärbt (siehe Kapitel 3.2.9). Wegen der sich anschließenden Fixation und Färbung für BrdU wurde dabei die doppelte Antikörperkonzentration benutzt. Mit Hilfe des APC BrdU Flow Kits (Fa. BD Biosciences, Heidelberg) wurde das in die DNA proliferierter Zellen eingebaute BrdU nach Protokoll des Herstellers gefärbt. Die weitere Analyse der Zellen erfolgte durchflusszytometrisch wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben.

3.2.11 Untersuchung der Migration von Zellen *in vivo*

Zur Gewinnung CFSE-markierter Einzelzellsuspensionen von Milzzellen, die nach dem Transfer in eine Maus mittels Durchflusszytometrie wieder detektiert werden können, wurden aus naiven C57BL/6 Mäusen die Milzen unter sterilen Bedingungen entnommen, zum Erhalt von Einzelzellen durch ein Zellsieb (100 μ m, Falcon, Fa. BD Biosciences, Heidelberg) gerieben, abzentrifugiert (300 \times g, 10 min), und die enthaltenen Erythrozyten durch Inkubation in „Red blood cell lysing buffer“ (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) für eine Minute auf Eis lysiert. Enthaltene Erythrozytenfragmente wurden durch zweimaliges Waschen entfernt, die Zellen in sterilem, LPS-freiem PBS aufgenommen und die Zellzahl durch Auszählen in der Neubauerkammer (siehe Kapitel 3.2.7.4) auf 5 - 10 \times 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Der Zellsuspension wurde dann CFDA-SE ((5-(und-6)-carboxyfluoresceindiacetat-succinimidylester, Molecular Probes) in einer Endkonzentration von 1 μ M zugegeben und für 10 min im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Dieses CFDA-SE ist leicht membrangängig und wird von Zellen rasch aufgenommen. Intrazellulär entsteht unter Einfluss von Esterasen das stark fluoreszierende, weniger membrangängige CFSE (5-(and-6)-carboxyfluorescein-succinimidylester), dessen Austritt aus der Zelle durch kovalente Bindung an Aminogruppen

intrazellulärer Moleküle verhindert wird. Mit jeder Teilung der Zelle halbiert sich jedoch die intrazelluläre CFSE-Konzentration und damit auch die Fluoreszenzintensität der Zelle, über die somit auch eine Proliferation von Zellen beobachtet werden kann (258). Nach der Inkubation mit CFDA-SE wurde die Reaktion durch Zugabe von FCS (Endkonzentration 5%) abgestoppt und die Zellen zweimal gewaschen. Die Analyse der in einem Lymphknoten nach s.c. Infektion von Mäusen mit Bartonellen einwandernden Zellen erfolgte durch den Transfer von 20×10^6 dieser CFSE-markierten Milzzellen in Mäuse, die zuvor mit *B. henselae* Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 infiziert worden waren (Tag 10 nach s.c. Infektion) bzw. in PBS-injizierte Kontrollmäuse. Der Zelltransfer erfolgte über die seitliche Schwanzvene unter Verwendung einer 1 ml-Einmalspritze („1ml Sub-Q“ 26G ½, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) in einem Volumen von 1 ml PBS. 4, 7 und 14 Tage nach Transfer wurden die drainierenden poplitealen sowie als interne Kontrolle die axillären und brachialen Lymphknoten der Tiere entnommen, deren Zellzahl bestimmt, und die Expression der Oberflächenmoleküle CD3, CD19, CD4 und CD8 sowie die CFSE-Fluoreszenz der Zellen durchflusszytometrisch wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben analysiert.

3.2.12 Generierung von dendritischen Zellen und Makrophagen aus Knochenmark der Maus

3.2.12.1 Gewinnung von Knochenmark aus Mäusen

Zur Isolation von Knochenmark wurden Mäuse unter CO₂-Narkose durch Luxation der Halswirbelsäule getötet und Femur und Tibia beider Hintergliedmaßen entnommen ohne dabei die Markhöhle zu eröffnen. Unter den sterilen Bedingungen einer Werkbank (HeraSafe, Fa. Heraeus, Hanau) wurden dann beide Epiphysen mit einer Schere entfernt und die Knochenmarkszellen aus der freigelegten Markhöhle mit sterilem, LPS-freiem PBS herausgespült, abzentrifugiert (4°C; 300xg; 10 min) und wie in den folgenden Kapiteln beschrieben zur Generierung von mDC, pDC und BM-MΦ verwendet.

3.2.12.2 Generierung von myeloiden dendritischen Zellen

Zur Generierung von mDC wurden Knochenmarkszellen von naiven C57BL/6 Mäusen nach dem Protokoll von Lutz et al. (156) mit einer Zellzahl von 4×10^5 /ml DC in Gewebekulturschalen (ø 94 mm, Fa. Greinerbio-one) ausgesät und in Medium mit 10% Kulturüberstand von Maus-GM-CSF-transfektierten Ag8653 Myelomzellen (267) bei 37°C,

95% Wasserdampfsättigung und 5% CO₂ in einem Brutschrank (HERAcell 240, Fa. Heraeus, Hanau) inkubiert. Am 3. Tag nach Ansetzen der Zellen wurde frisches Medium mit 10% des oben genannten Überstands im Verhältnis 1:1 zugegeben. Am 6. Tag wurde die Hälfte des Zellkulturmediums durch frisches Medium mit 10% des oben genannten Überstands ersetzt. Die dadurch generierten, nicht adhärenen mDC wurden entweder an Tag 7 oder 8 geerntet oder aber an Tag 8 nochmals wie an Tag 6 gefüttert und schließlich an Tag 9, 10 oder 11 geerntet.

Der Anteil der so generierten CD11b⁺CD11c⁺ mDC wurde durchflusszytometrisch (siehe Kapitel 3.2.9) bestimmt und lag zwischen 80 und 90%. Als Maß für die Reife der Zellen wurde auch die Expression von MHC Klasse II-Antigenen durchflusszytometrisch bestimmt. Der Anteil der reifen, CD11b⁺CD11c⁺MHCII^{high} mDC betrug zwischen 36 und 75%.

3.2.12.3 Generierung von Knochenmarksmakrophagen

Zur Generierung von Makrophagen aus Mausknochenmark (BM-MΦ) wurden nach der von Munder et al. (179) beschriebenen Methode je 6×10^6 Knochenmarkszellen von naiven C57BL/6 Mäusen in pferdeserumhaltigem Differenzierungsmedium für BM-MΦ (Zusammensetzung siehe Anhang) mit 5 ng/ml rekombinanten murinen M-CSF (rmM-CSF, Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA) aufgenommen und in hydrophoben Teflon[®] Schläuchen bei 37°C, 90% Wasserdampfsättigung und 10% CO₂ liegend inkubiert. Nach 7 - 8 Tagen Reifung wurden die adhärenen Makrophagen aus dem Schlauch geerntet und in frischem Medium aufgenommen.

Die verwendeten Teflon[®] Schläuche wurden zuvor aus Teflon[®] Folie (FEP 100 Fluorocarbon Film, Fa. Du Pont, Vertrieb über Cadillac Plastic, Karlsruhe) hergestellt. Dazu wurden ungefähr 10 × 25 cm große Stücke ausgeschnitten, über die kurze Seite so gefaltet, dass die hydrophobe Seite innen zu liegen kam, und an der langen sowie einer kurzen Seite mit einem Schweißgerät (Polystar 350 DSM, Fa. Polystar, Hamburg) verschlossen. Die Sterilität der Schläuche wurde durch eine anschließende Gassterilisation mit Ethylenoxid (Anprolene-Ampullen, Fa. Andersen Products) gewährleistet.

3.2.12.4 Generierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen

Zur Gewinnung von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) wurden Knochenmarkszellen von Mäusen nach Lyse der enthaltenen Erythrozyten in „Red Blood Cell

Lysing Buffer“ (1 min auf Eis; Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) und zweimaligem Waschen in Medium zur Generierung von pDC (Zusammensetzung siehe Anhang) bei einer Zellzahl von 2×10^6 /ml in Gegenwart von 100 ng/ml rekombinanten Maus-*fms-like Tyrosine Kinase-3* (Flt-3) Ligand (Fa. R&D Systems, Minneapolis, USA) in kleinen Zellkulturflaschen (5 ml/Flasche; 25 cm², Corning® Flask 3055, Fa. Corning Incorporated, Corning, USA) bei 37°C, 95% Wasserdampfsättigung, und 5% CO₂ in einem Brutschrank (HERAcell 240, Fa. Heraeus, Hanau) inkubiert. Vier Tage nach Beginn der Inkubation wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Medium zur Generierung von pDC mit 100 ng/ml Flt-3 Ligand ersetzt. Nach 3 oder 4 weiteren Tagen Inkubation wurden die nicht adhärenen Zellen geerntet, gewaschen und die Gesamtzellzahl bestimmt. Die Zellen wurden anschließend in ~2 ml „Fc-Block“ (s. Kapitel 3.2.3.8) / $5 - 10 \times 10^7$ Zellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die für das Sortieren notwendige Markierung der Zelloberflächenmoleküle erfolgte durch 30 Minuten Inkubation der Zellen auf Eis mit den in Kapitel 3.2.9 aufgeführten Antikörpern gegen CD11b (FITC-konjugiert), CD11c (PE-konjugiert) und CD62L (APC-konjugiert) (je $1 - 5 \mu\text{l}/5 \times 10^6$ Zellen). Überschüssige Antikörper wurden gewaschen und die Zellen in PBS/1% FCS (20×10^6 Zellen/ml) resuspendiert.

Das sich anschließende Sortieren der pDC als CD11b⁻CD11c^{int}CD62L⁺ Zellen wurde in einer zentralen Einrichtung des Universitätsklinikums Freiburg mit einem Gerät des Typs MoFlo, Fa. Cytomation, Fort Collins, USA durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Teil der sortierten Zellen nochmals durchflusszytometrisch auf die genannten Eigenschaften reanalysiert.

3.2.13 Kultivierung und Stimulation von mDC, BM-MΦ und pDC

Die Zellen wurden nach ihrer Generierung in antibiotikafreiem Medium für den jeweiligen Zelltyp (siehe Anhang) aufgenommen und bei 37°C, 95% Wasserdampfsättigung, und 5% CO₂ in einem Brutschrank (HERAcell 240, Fa. Heraeus, Hanau) inkubiert.

In Versuchen, in denen Überstände zur Analyse gewonnen werden sollten, wurden die Zellen bei einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/well in 96-well Platten (Microtest™ 96 Zellkulturplatte, Fa. Becton Dickinson Labware; mDC, BM-MΦ: Flachboden; pDC: Rundboden) in 200 μl Medium ausgesät und in einem Volumen von 50 μl gelöste Stimulantien zugegeben. Nach 48 h Kultivierung wurden die Zellkulturnapfe makro- und mikroskopisch begutachtet, die Überstände abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Die verschiedenen Stimulationen wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche parallel in Medium ohne Stimulans kultiviert wurden. Als Positivkontrolle wurden

mDC und BM-M Φ mit Lipopolysaccharid (200 ng/ml *E.coli* O111B4 LPS, Fa. Sigma), rekombinantem murinem Interferon- γ (20 ng/ml; rm IFN- γ , erhalten von Dr. G. Adolf, Ernst Boehringer Institut für Arzneimittelforschung, Wien), rekombinantem murinem Tumor Nekrose Faktor (10 ng/ml; rmTNF, Fa. R&D Systems) bzw. mehreren dieser Substanzen stimuliert, während pDC mit CpG 2216 (1 μ M, Fa. Thermo Electron) inkubiert wurden. Für einige Versuche wurden pDC vor Zugabe der Stimulantien 2 Stunden in Medium mit 0,01 mM, 0,005 mM oder 0,001 mM Chloroquin (Chloroquinediphosphat, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) vorinkubiert.

mDC, deren Reifung durch Bartonellen beurteilt werden sollte, wurden an Tag 10 nach Beginn ihrer Generierung geerntet und bei einer Zellzahl von $1,5 - 2 \times 10^6$ /ml in 6-well Platten (MircotestTM 6, Flachboden, Fa. Becton Dickinson Labware) ohne und mit Bartonellen für 24 Stunden kultiviert.

Für die Präparation von RNA wurden je 1×10^6 pDC in 24-well Platten (MicrotestTM 24 Zellkulturplatte, Flachboden, Fa. Becton Dickinson Labware) in 2 ml Medium mit 500 μ l Stimulans kultiviert, nach 24 h geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Bis zur Aufreinigung der RNA wurden die Zellen in 350 μ l RNeasyTM RNA Stabilization Reagent (Fa. Qiagen, Hilden) bei -80°C gelagert.

3.2.14 Nitritbestimmung über Griess-Reaktion

Als Hinweis für die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) wurde die Akkumulation des daraus hervorgehenden stabilen Endproduktes Nitrit (NO₂⁻) im Zellkulturüberstand gemessen. Die Menge an Nitrit kann in der Griess-Reaktion anhand eines Farbumschlags photometrisch bestimmt werden, wobei Natriumnitrit als Standard verwendet wird (99). Für die Griess-Reaktion wurden die fraglichen Proben mit gleichem Volumen einer 1:1-Mischung aus 1% (w/v) Sulfanilamid in 5% (v/v) Phosphorsäure mit 0,1% (w/v) Naphthyl-Ethylendiamin-Dihydrochlorit (NEDD) versetzt. Die Intensität des dabei entstehenden rosa Azofarbstoffs verhält sich proportional zum Nitritgehalt der Probe und wurde durch Absorption bei 550 nm mit Hilfe eines ELISAPlatten-Lesegerätes (SPECTRAMax 340 PC, Software SoftMax Pro 4.6, Fa. Molecular Devices) gemessen. Die Konzentration wurde durch den Bezug auf das Grundmedium (Blank) und eine Standardkurve (Natriumnitrit; 100 μ M - 1,56 μ M) berechnet.

3.2.15 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Bestimmung von Zytokinen

Zur spezifischen Quantifizierung von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurden „Sandwich“-ELISAs durchgeführt. Bekannte Mengen des nachzuweisenden Proteins wurden zur Erstellung einer Eichkurve in einer Verdünnungsreihe mitgeführt.

Allen durchgeführten ELISAs gemeinsam war die Verwendung von flexiblen 96well Rundboden-Mikrotiterplatten (Fa. Dynatech, Denkendorf), das Inkubieren in feuchten Kammern zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten und die abschließende Messung in einem ELISA-Platten-Lesegerätes (SPECTRAMax 340 PC, Software SoftMax Pro 4.6, Fa. Molecular Devices). Auf jeder Platte wurde zudem eine Negativkontrolle bestehend aus beiden Antikörpern ohne Antigen sowie zur Kontrolle der Antikörper Ansätze mit jeweils nur einem der beiden Antikörper mitgeführt.

Der Nachweis von **TNF** erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Testsystem (DuoSet ELISA[®] Development Kit For Mouse TNF, Fa. R&D Systems) nach Angaben des Herstellers. **IL-12** wurde mit zwei verschiedenen ELISAs entweder anhand seiner Untereinheit p40 oder als bioaktives IL-12p70 (bestehend aus den Untereinheit p35 und p40) nachgewiesen. In Tabelle 22 sind die einzelnen Arbeitsschritte und Reagenzien zur Durchführung dieser beiden ELISAs aufgeführt. Nach den Schritten 1 - 4 wurden die Inkubationsnäpfe viermal, nach Schritt 5 achtmal mit PBS/0,05% (v/v) Tween 20 (Fa. Merck, Darmstadt) gewaschen.

Tabelle 22: IL-12p40 und IL-12p70-ELISA

		IL-12p40	IL-12p70
1.	„Coating“	Monoklonaler, gereinigter Ratte (IgG ₁) anti-Maus IL-12 (p40/p70)-Antikörper (Klon C15.6) Konz.: 1 mg/ml (Fa. BD Biosciences Pharmingen) 1:200 verdünnt in PBS	Monoklonaler, Hamster (IgG)- und Ratten (IgG2a)-anti-Maus IL-12 (p35/p70)-Antikörper-Cocktail (Klone Red-T G297-289) Konz.: 2 mg/ml (Fa. BD Biosciences Pharmingen) 1:300 verdünnt in 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , pH 6,0
		Inkubation von je 50 µl Antikörper / Well über Nacht bei 4°C	
2.	„Blocking“	50 µl PBS / 10% FCS je Well, Inkubation für 1-3h bei RT	
3.	„Capturing“	Inkubation von 50 µl Probe bzw. je 50 µl Standard (rekombinantes murines IL-12, Fa. R&D Systems, 5000 pg/ml bis 19 pg/ml) je Well über Nacht bei 4°C	
4.	„Detection“	Monoklonaler, biotinylierter Ratte-anti-Maus IL-12 (p40/70)-Antikörper (Klon C17.8) Konz.: 0,5 mg/ml (Fa. BD Biosciences Pharmingen) 1:500 verdünnt in PBS/10%FCS Inkubation von 50 µl/Well für 1h bei RT	

		IL-12p40	IL-12p70
5.		Inkubation mit 50 μ l/Well StreptABComplex AP (Fa. DAKO, Hamburg), nach Vorschrift des Herstellers angesetzt, für 1 h bei RT	
6.		Zügige Zugabe von Substratlösung, 50 μ l / Well (1 mg/ml PNPP in Diethanolaminpuffer; Phosphatase Substrate 40 mg Capsules, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Abwarten der Farbreaktion im Dunkeln	
7.	Messen	Mehrmales Messen der optischen Dichte bei 405 nm bis niedrigster Standardwert >0,005	

3.2.16 Nachweis von Typ I Interferon

3.2.16.1 Quantitative Bestimmung der Interferon- α/β -mRNA Expression

Die zu untersuchenden Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.13 beschrieben stimuliert und geerntet. Die RNA der Zellen wurden mit dem RNeasy Protect Mini Kit (Fa. Quiagen, Hilden) entsprechend der Herstellerprotokolle zur RNA Stabilisierung in Zellkulturzellen und zur Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Zellen aufgereinigt und in 60 μ l Wasser eluiert. Da Typ I Interferone durch intronlose Gene kodiert werden (245), wurde die gesamte RNA anschließend einem DNase-Verdau mit dem DNA-free™ Kit (Fa. Ambion) unterzogen: Nach Zugabe von 10 \times DNaseI Puffer wurde die eluierte RNA zweimal mit je 1 μ l DNase für je 30 min bei 37°C inkubiert und die DNase schließlich mit Inaktivierungsreagenz nach Angabe des Herstellers wieder entfernt. Die DNA-Freiheit der RNA wurde in einer PCR (siehe Kapitel 3.2.6.2), die bei Anwesenheit von DNA zu einer Amplifikation des β -Actin-Gens führen würde, kontrolliert. Hierzu wurden 5 μ l der RNA in Aq. ad inj. mit 10 \times Puffer, je 250 μ M der dNTPs, je 200 nM Primer Actin p1 bzw. Actin p2 und 1 Unit Taq DNA-Polymerase versetzt und nach dem in Tabelle 24 angegebenen Schema amplifiziert. Proben, die ein positives PCR-Ergebnis aufwiesen, wurden nochmals einem Verdau mit DNase unterzogen.

Tabelle 23: Primer zur Amplifikation des murinen β Actin-Gens

Bezeichnung	Ziel-organismus	Sequenz	Länge des Amplifikats	Bezugsquelle
actin p1	Maus	5'-CACCCGCCACAGTTCGCCA-3'	~500 bp	Fa. Thermo Electron, Ulm
actin p2		5'-CAGGTCCCGGCCAGCCAGGT-3'		Fa. Thermo Electron, Ulm

Tabelle 24: Temperatur-Zeit-Protokoll zur Amplifikation des murinen β Actin-Gens

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94°C	5 min
2	35	94°C	30 s
		60°C	30 s
		72°C	30 s
3	1	72°C	10 min
4	1	4°C	∞

Der Gehalt der verbliebenen RNA wurde schließlich photometrisch bei 260 nm bestimmt (BioPhotometer; UVette[®] 50-2000 μ l, 220-1600 nm; Fa. Eppendorf Hamburg). Das Umschreiben von 1 μ g RNA in cDNA erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Archive Kit (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) in einem Thermocycler (cyclone gradient, Fa. Peqlab Bioechnologie GmbH, Erlangen) in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf, Hamburg) nach Angaben des Herstellers. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

Der eigentliche Nachweis der mRNA-Expression einer Auswahl der 14 Interferon- α -Subtypen ($-\alpha$ 4, $-\alpha$ 5, $-\alpha$ 9, $-\alpha$ 11, $-\alpha$ 12, $-\alpha$ 13) sowie von Interferon- β im Vergleich zur konstitutiv exprimierten Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) erfolgte in einer quantitativen real-time PCR (Taqman) in Dreifach-Ansätzen. Ein Reaktionsansatz (15 μ l) enthielt 20 ng cDNA, 2x Taqman Universal Mastermix (Fa. Applied biosystems) und 0,75 μ l Assays-on-Demand (Fa. Applied Biosystems) mit dem entsprechenden Primerpaar und einer 6-carboxy-fluorescein (FAM)-konjugierten Sonde für das Zielgen. Zur Amplifikation und Detektion wurde das Gerät ABI Prism 7900 Sequence Detector (Fa. Applied Biosystems) nach dem in Tabelle 25 angegebenen Temperatur-Zeit-Protokoll verwendet.

Tabelle 25: Temperatur-Zeit-Protokoll zur Amplifikation der Typ I Interferon-Gene im Taqman

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	50°C	2 min
2	1	95°C	10 min
3	40	95°C	15 s
		60°C	1 min

Mit Hilfe der Gerätesoftware SDS2.1 (Fa. Applied Biosystems) wurde die Anzahl der Typ I Interferon-Genkopien anhand des C_T -Werts (C_T -Werts = threshold cycle= Zykluszahl, ab der die durch den Zerfall der Sonde während einer spezifischen Amplifikation freigesetzte Fluoreszenz messbar wird) bestimmt und normalisiert auf die Expression von HGPRT.

3.2.16.2 Nachweis von Interferon- α/β -Protein durch VSV-Bioassay

Typ I Interferone (Interferon- α/β) können aufgrund ihrer antiviralen Eigenschaften den zytopathischen Effekt von Viren hemmen und dadurch das Absterben von virusinfizierten Zellen verhindern. Diese Wirkweise von Typ I Interferonen kann genutzt werden, um sie mittels eines Bioassays zu detektieren (116, 269). In der vorliegenden Arbeit wurden hierzu je $1,5 \times 10^4$ murine L929-Fibroblasten in 96-well Platten (Mircotest™ 96, Flachboden, Becton Dickinson Labware) in Triplikaten mit Zellkulturüberständen (1:2 bis 1:65536 in 2er-Schritten sequentiell verdünnt in Medium für VSV-Bioassay) über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden Zellen parallel mit bekannten Mengen von gereinigtem, virusinduzierten Maus-IFN- α/β (maximale Konzentration 100 U/ml; erhalten von Prof. Ion Gresser, Institut Curie, Paris) inkubiert. Diese Präinkubation der L929-Fibroblasten mit den Überständen verhindert im Falle des Vorhandenseins von Typ I Interferonen eine Lyse der Zellen nach Zugabe von Vesikulärem Stomatitis Virus (VSV). Das VSV wurde als 1:4000 Verdünnung einer Viruspräparation (ursprünglich erhalten von Dr. Rainer Zawatzky, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) zu den präinkubierten Zellen gegeben und die Ansätze für weitere 48 h bei 37°C inkubiert.

Die verbleibende Zellviabilität wurde im Anschluß in einem MTT-Test bestimmt. Dazu wurden je well 10 μ l einer 10 mg/ml-MTT-Stammlösung (Thiazolylblau, Fa. Roth, Karlsruhe) zugegeben und für 5 - 6 h inkubiert. In dieser Zeit können lebende Zellen das gelbe MTT, ein Tetrazoliumsalz (3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen in violette Formazankristalle umwandeln und einlagern. Durch die Zugabe von 100 μ l SDS-Lösung (10% [w/v] pH 2.5-2.8) wurde die Reaktion durch Lyse der Zellen abgestoppt und das aus den Zellen freigesetzte Formazan bei anschließender Inkubation über Nacht gelöst. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 550 nm (SPECTRAMax 340 PC, Software SoftMax Pro 4.6, Fa. Molecular Devices). Der relative Gehalt (*Arbitrary Units*) an IFN- α/β pro Milliliter Kulturüberstand wurde berechnet durch Bestimmung der Probenverdünnung bzw. des Probenvolumens, welches gerade 50% der Zellen vor Lyse schützt (d.h. bei welchem 50% des höchsten gemessenen OD_{550nm}-Wertes erreicht wird). Dieses Probenvolumen entspricht per definitionem 1 U/ml. Durch Vergleich mit der mitgeführten IFN- α/β -Standardpräparation bekannter Aktivität konnten Unterschiede in der IFN- α/β -Sensitivität der L929 Zellen von Test zu Test ausgeglichen werden. Als Bezugspunkte für die Extinktionsmessung und zur Kontrolle des Virus-Zell-Systems wurden jeweils Ansätze ohne Zellen bzw. mit Zellen aber mit oder ohne Viruszugabe mitgeführt.

Die Spezifität der Lysishemmung durch Typ I Interferone wurde durch eine Präinkubation der Zellkulturüberstände mit anti-IFN- α/β -Antiserum kontrolliert (116). Die Proben wurden dazu 1:2 mit affinitätsgereinigtem anti-IFN- α/β -Antiserum vom Schaf (erhalten von Prof. Ion Gresser, Institut Curie, Paris), dem entsprechendem Kontroll-Antiserum bzw. Medium verdünnt und 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie gewohnt im VSV-Bioassay eingesetzt. Der positive Nachweis von Typ I Interferonen konnte nach Inkubation mit anti-IFN- α/β -Antiserum, nicht jedoch mit Kontroll-Antiserum oder Medium aufgehoben werden.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der verwendeten *B. henselae*-Primärisolate

In der vorliegenden Arbeit wurden für einige Versuche *B. henselae*-Stämme verwendet, die aus dem Blut natürlich infizierter Hauskatzen isoliert wurden, welche aufgrund einer KKK ihrer Besitzer untersucht worden waren. Die Spezies *B. henselae* ist jedoch nicht homogen, sondern es können Subtypen differenziert werden, welche möglicherweise Virulenzunterschiede aufweisen (46, 118, 189, 263). Der experimentelle Einsatz von Primärisolaten erfordert deswegen deren nähere Charakterisierung. Da einige der Stämme aus verschiedenen Katzen desselben Haushalts isoliert wurden (Fr96/K4 - 6, Fr99/K9 - 12 und Fr00/K13 - 15), stellte sich zusätzlich die Frage nach Unterschieden zwischen diesen Stämmen.

Anhand der Charakterisierung sollte eine Auswahl mehrerer Stämme für spätere Infektionsversuche *in vivo* getroffen werden.

4.1.1 Beurteilung der Kolonimorphologie

B. henselae-Kolonien können zwei verschiedene Formen aufweisen: langsam wachsende, trockene, adhärenzte und leicht in den Agar eingebettete Kolonien (*Slow-growing, Dry Agar-pitting* [DAP]) im Vergleich zu schneller wachsenden, cremigen und wenig adhärenzten Kolonien (*Faster-growing, Smooth Non-agar-pitting* ([SNP])). Erst genannte Kolonieform tritt in der Regel bei Anzucht aus infiziertem Gewebe auf und geht nach mehreren Passagen *in vitro* in die zweite Form über (141, 203). Die Veränderung der Kolonimorphologie resultiert möglicherweise aus der unterschiedlichen Wachstumsrate zweier Zellpopulationen, bei der die schnellere SNP-Form schließlich überwiegt. Einige bereits als SNP-Form wachsende Stämme können wieder als DAP-Form angezüchtet werden, sobald sie erst nach 29 - 30 Tagen auf frischen Nährboden überführt werden; dies resultiert möglicherweise aus der besseren Überlebensfähigkeit der DAP-Form (141). Eine Folge der unterschiedlichen Wachstumsformen ist die höhere Adhärenz von *B. henselae* aus DAP-Kulturen an humane Epithelzellen und eine stärkere Invasion in diese Zellen *in vitro* im Vergleich zu Bakterien aus SNP-Kulturen (19). Der Wechsel der Kolonieform geht einher mit einer Veränderung der äußeren Membranproteine, die Expression von LPS wird jedoch nicht beeinflusst. Durch eine DNA-Fingerprint-Technik konnten auf Genomebene Veränderungen von Stämmen in Assoziation mit einem Wechsel der Kolonimorphologie beobachtet werden (141).

Für diese Arbeit wurde das Wachstumsverhalten von 14 Primärisolaten über mindestens 25 Passagen bei regelmäßiger Subkultivierung verfolgt.

Unter den Primärisolaten gab es bezüglich des Wechsels der Kolonieform drei Varianten: ein stets in der SNP-Form wachsender Stamm (Fr97/K7), mehrere zunächst als DAP-Kolonien, nach 10 - 20 Passagen jedoch als SNP-Kolonien wachsende Stämme (Fr98/K8, Fr98/K8aM, Fr96/K2 - K6, Fr99/K9 - K12, Fr00/K13 - K15) und ein stets in DAP-Form wachsender Stamm (Fr02/K16). Unter denselben Kultivierungsbedingungen wuchsen die Referenzstämme *B. henselae* ATCC 49882 stets als SNP-, *B. henselae* Marseille stets als DAP-Kolonien. Ein Wechsel der SNP- zur DAP-Koloniemorphologie wurde bei keinem der Primärisolate beobachtet.

Für die weitere Charakterisierung der Isolate und spätere *in vivo* und *in vitro*-Experimente wurden ausschließlich Bakterien aus DAP-Kulturen verwendet. Ausnahmen waren der lediglich als SNP-Form auftretende Stamm Fr97/K7 sowie der Referenzstamm ATCC 49882.

4.1.2 Zuordnung zu Genotyp I bzw. II

Eine gängige Einteilung von *B. henselae*-Subtypen, die auch bei vielen Studien zur Prävalenz und Virulenz genutzt wurde, ist ihre Zuordnung zu Genotyp I (Houston) und II (Marseille) anhand der 16S rDNA Sequenz (22). Zur Unterscheidung werden zwei genotypspezifische Primerpaare verwendet.

Von den 14 untersuchten *B. henselae*-Isolaten erwies sich lediglich *B. henselae* Fr97/K7 als Genotyp I, alle anderen untersuchten Primärisolate waren vom Genotyp II (siehe Abbildung 4). Der als Kontrolle verwendete Referenzstamm ATCC 49882 (=Houston 1) wird dem Genotyp I zugeordnet.

Stämme, die aus verschiedenen Katzen eines Haushalts isoliert wurden, wiesen denselben Genotyp auf. Zur Differenzierung zwischen diesen Isolaten waren deswegen weitere Untersuchungen notwendig.

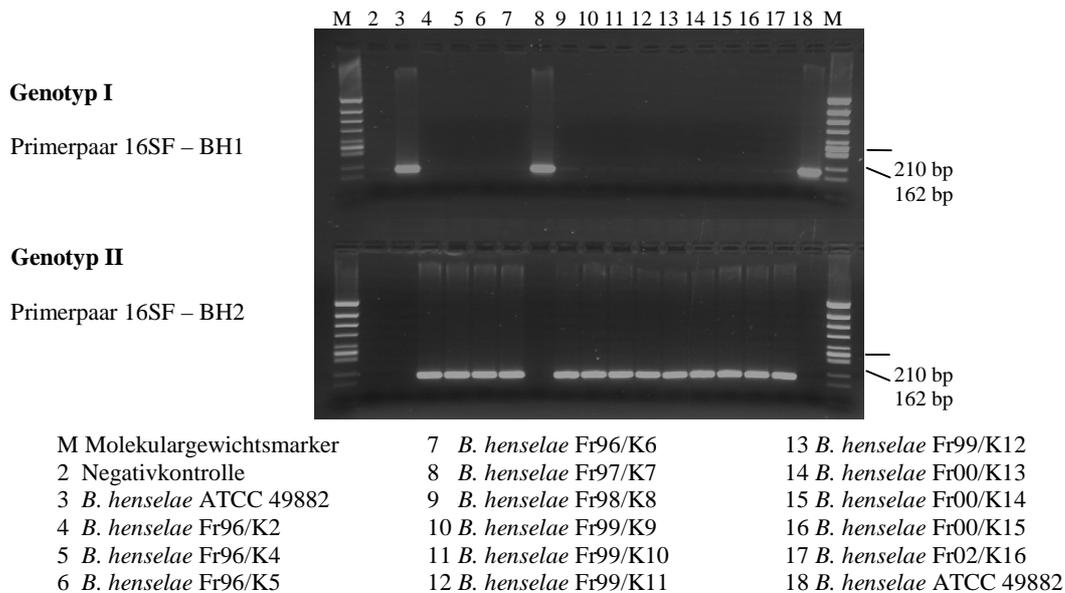


Abbildung 4 Genotypisierung der *B. henselae*-Primärisolate: Aus genomischer DNA (10 ng) der *B. henselae*-Isolate wurde ein 185 bp langes Fragment des 16S rRNA-Gens amplifiziert. Verwendet wurden hierzu zwei verschiedene jeweils genotypspezifische Primerpaare, die von Bergmans et al. (22) zur Unterscheidung von *B. henselae* Genotyp I und II beschrieben wurden. Je 20 µl Amplifikat wurden in einem 2,5%igen Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet. Als Molekulargewichtsmarker wurde „ΦX174 RF DNA *Hinc* II“ (Fa. ABgene) aufgetragen.

4.1.3 Unterscheidung der einzelnen Primärisolate mittels DNA-Fingerprint-Techniken

Mögliche Unterschiede zwischen den *B. henselae*-Isolaten, insbesondere zwischen Isolaten aus Katzen eines Haushaltes, sollten mittels dreier DNA-Fingerprint-Techniken analysiert werden. Dabei handelte es sich um eine *Arbitrarily Primed*-PCR (Primer für Bakteriophage M13 [AP-PCR]), eine *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*-PCR (ERIC-PCR) sowie eine *Repetitive Extragenic Palindromic*-PCR (REP-PCR), mit deren Hilfe bereits mehrere Varianten von *B. henselae* unterschieden wurden (70, 217). Für die in dieser Arbeit untersuchten Isolate wurde das Bandenmuster nach Durchführung der drei genannten Techniken verglichen (siehe Abbildung 5).

Unterschiede zwischen den zwei Stämmen des Genotyps I und denen des Genotyps II konnten anhand des Bandenmusters nach allen drei PCR-Typen gesehen werden, am deutlichsten jedoch mit Hilfe der AP-PCR. Innerhalb eines Genotyps traten weitere Unterschiede auf: so wiesen der Referenzstamm *B. henselae* ATCC 49882 und das Primärisolat *B. henselae* Fr97/K7, beide Genotyp I, nach AP-PCR und ERIC-PCR deutlich unterschiedliche Bandenmuster auf. Dieser Unterschied bestätigte sich in der REP-PCR in Form einer zusätzlichen Bande (zwischen 300 – 400 bp) bei *B. henselae* Fr97/K7. Das Bandenmuster der Stämme vom Genotyp II war insgesamt sehr einheitlich. Auffällig war

jedoch das Fehlen einer Bande (zwischen 400 und 500 bp) nach REP-PCR bei den aus Katzen eines Haushalts isolierten *B. henselae* Fr99/K9, -K10, -K11 und -K12 im Vergleich zum Bandenmuster der anderen Stämme vom Genotyp II. Weitere Unterschiede beruhten auf Schwankungen der Intensität einzelner Banden, die jedoch objektiv nicht weiter ausgewertet wurden. Das Bandenmuster von Isolaten aus verschiedenen Katzen desselben Haushalts ließ keinen Unterschied erkennen.

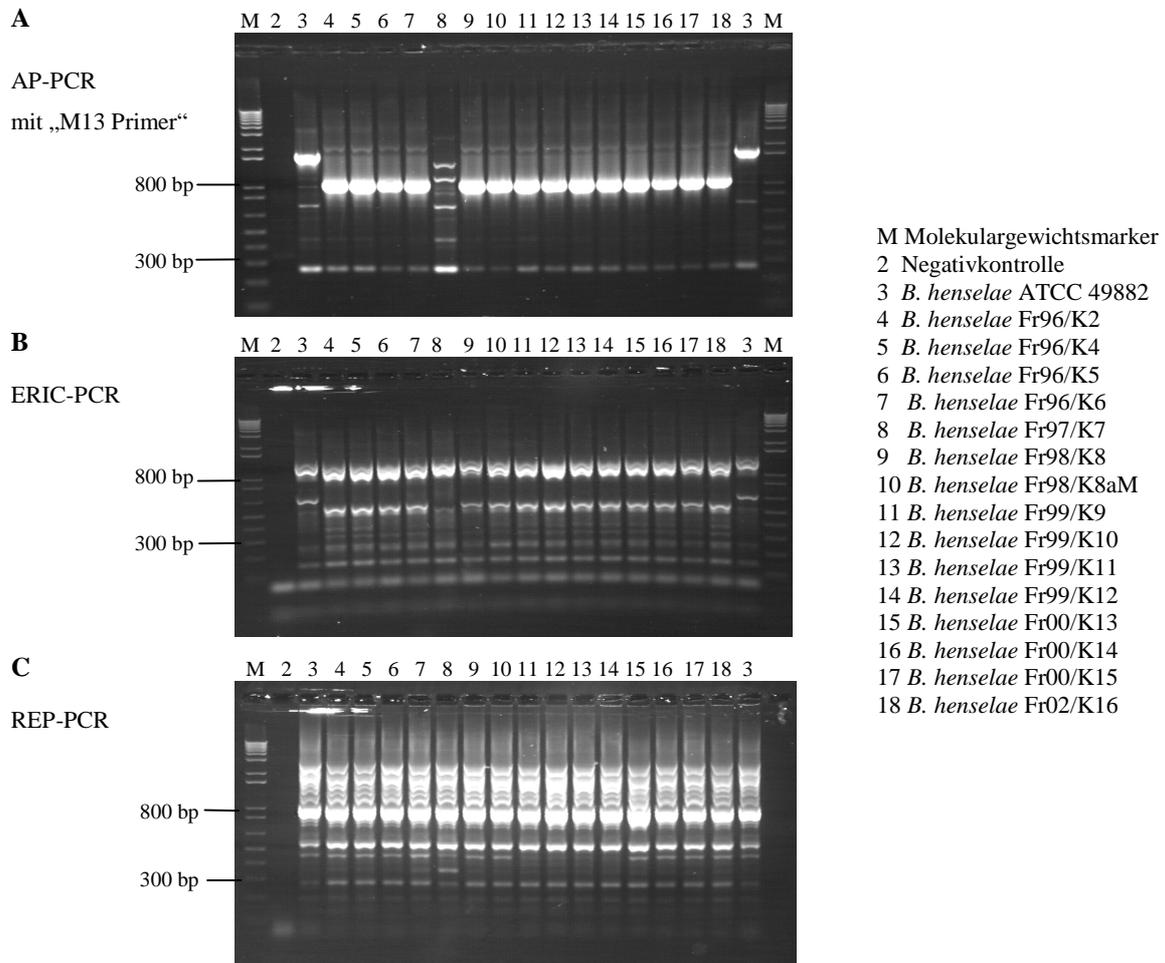


Abbildung 5 Arbitrarily Primed- (AP-), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- (ERIC-) und Repetitive Extragenic Palindromic- (REP-) -PCR mit DNA aus *B. henselae*-Primärisolaten: Mittels dreier DNA-fingerprint Techniken wurde genomische DNA (100 ng) der *B. henselae* Primärisolate amplifiziert und die einzelnen Isolate anhand des erhaltenen Bandenmusters verglichen. **A.** AP-PCR Amplifikation mit Hilfe eines für die Kernsequenz des Bakteriophagen M13 spezifischen Primers („M13 Primer“) **B.** ERIC-PCR Amplifikation über Primer spezifisch für repetitive, extragenetisch lokalisierte DNA-Sequenzen im eubakteriellen Genom **C.** REP-PCR Amplifikation über Primer spezifisch für palindrome, nicht-kodierende DNA-Abschnitte im eubakteriellen Genom. Dargestellt sind repräsentative Bandenmuster nach Auftrennung von 20 µl Amplifikat in einem 1%igen Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid und Auswertung unter UV-Licht. Als Molekulargewichtsmarker wurde „100 bp DNA Ladder“ (Fa. GIBCO BRL) aufgetragen.

4.1.4 Nachweis des virB4-Gens

Das virB4-Gen kodiert für eine Untereinheit eines der beiden bei *B. henselae* vorhandenen Typ IV-Sekretionssysteme (T4SS). Diese Transportsysteme Gram-negativer Bakterien

ermöglichen sowohl einen interbakteriellen DNA-Austausch als auch die Sekretion von Virulenzfaktoren in eukaryontische Zielzellen. Das *virB*/VirD4-T4SS von Bartonellen wird u.a. aufgrund seiner Beteiligung an der Invasion von Bartonellen in Erythrozyten und Endothelzellen als ein wichtiger Pathogenitätsfaktor angesehen (221). Mittels dreier Primerpaare konnten Woestyn et al. Teile des *virB4*-Gens aus *B. henselae*-Stämmen, die aus Patienten mit KKK isoliert wurden, amplifizieren (259).

Auch für alle der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *B. henselae*-Isolate konnte das *virB4*-Gen mit Hilfe der drei beschriebenen Primerpaare (259) nachgewiesen werden. Bei gleicher DNA-Ausgangsmenge konnte bei *B. henselae* Fr97/K7 nach allen drei PCRs am wenigsten Amplifikat detektiert werden (siehe Abbildung 6).

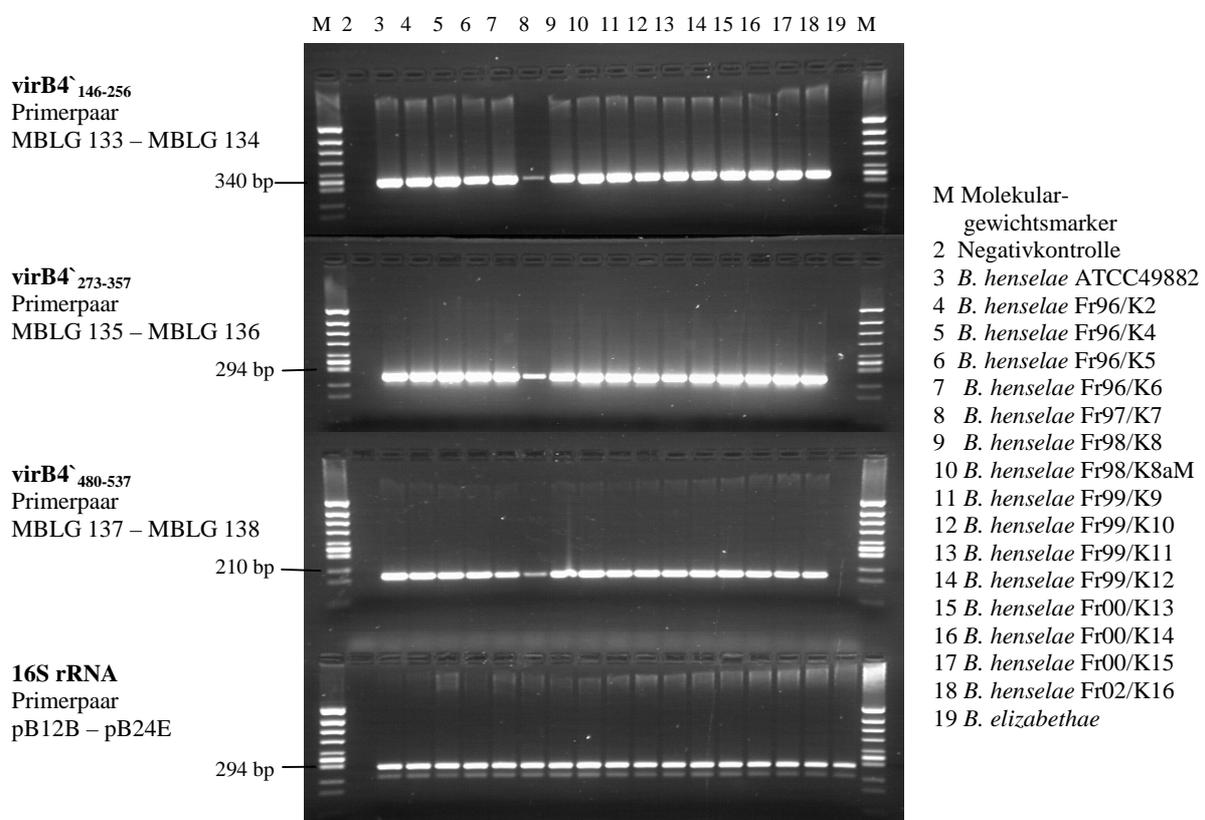


Abbildung 6 Nachweis des *virB4*-Gens der *B. henselae*-Isolate: Mehrere Abschnitte des *virB4*-Gens, das für eine Untereinheit eines Typ IV-Sekretionssystems von *B. henselae* kodiert, wurden aus genomischer DNA (2 ng) der *B. henselae*-Isolate mit Hilfe von drei Primerpaaren amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde neben einem Ansatz ohne DNA auch genomische DNA von *B. elizabethae* verwendet. Zur Kontrolle des DNA-Gehalts wurde eine PCR mit Primern spezifisch für das 16S rRNA-Gen von *Bartonellaceae* durchgeführt. Je 20 µl Amplifikat wurden in einem 2,5 %igen Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet. Als Molekulargewichtsmarker wurde „ΦX174 RF DNA *Hinc* II“ aufgetragen.

4.1.5 Nachweis des äußeren Membranproteins BadA

Riess et al. (208) identifizierten das von *B. henselae* exprimierte, 340 kDa große äußere Membranprotein Bartonella Adhesin A (BadA), dem sie eine Bedeutung als Virulenzfaktor v.a. bei der Entstehung vasoproliferativer Veränderungen zuschreiben. Nicht alle *B. henselae*-

Stämme exprimieren aufgrund genetischer Variabilität BadA. Die in Infektionsversuchen während dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden in einem Western-Immunoblot mit Hilfe eines Kaninchen-anti-BadA-Serums auf die Expression von BadA untersucht. Als Kontrollen wurden der BadA-negative Referenzstamm ATCC 49882 sowie eine BadA-defiziente Transposonmutante des Referenzstammes Marseille, als Positivkontrolle der unveränderte Stamm Marseille verwendet.

Das BadA-Protein konnte bei *B. henselae* Fr98/K8, Fr98/K8aM, Fr97/K7, Fr99/K11, Fr00/K13 nachgewiesen werden. Nicht oder nur sehr schwach jedoch war es bei *B. henselae* Fr00/K14, Fr00/K15 und Fr02/K16 nachweisbar.

Mit dem verwendeten Antikörper wurden bei der BadA-negativen Mutante auch einige, sowie bei BadA-positiven Stämmen viele weitere, kleinere Proteine detektiert (siehe Abbildung 7).

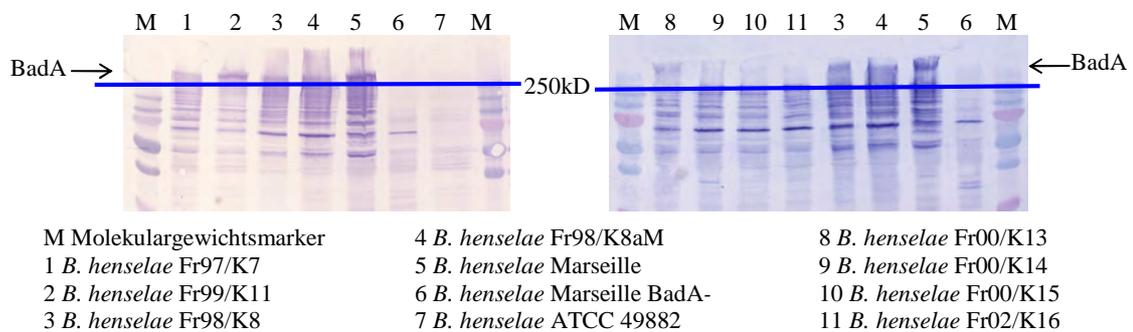


Abbildung 7 Analyse der Expression des äußeren Membranproteins BadA in *B. henselae*-Isolaten mittels Western-Immunoblot: Auf Hämatinagar für vier Tage kultivierte *B. henselae*-Stämme wurden in PBS eingerührt und nach Denaturierung in Probenpuffer nach Lämmli auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Immobilon PVDF Membran transferiert und das gesuchte BadA durch Serum eines mit BadA immunisierten Kaninchens detektiert, anschließend mit einem Alkalische-Posphatase konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper markiert und mit einer Substratlösung 6 - 8 min entwickelt. Zur Größenbestimmung wurde „Precision Plus Protein Standards“ als Molekulargewichtsmarker mitgeführt.

4.1.6 Auswahl der im Weiteren verwendeten *B. henselae*-Primärisolate sowie Zusammenfassung der Eigenschaften dieser Stämme

Anhand von Koloniemorphologie, Genotypzugehörigkeit, der Ergebnisse der verschiedenen DNA-Fingerprint- und virB4-Gen-Analysen sowie der BadA-Expression wurde eine Auswahl an Primärisolaten für spätere *in vivo*-Untersuchungen wie folgt getroffen:

Der Stamm Fr97/K7 wurde aufgrund seiner Zugehörigkeit zu Genotyp I, seiner Koloniemorphologie (stets als SNP-Form) und seiner möglichen Abweichung im virB4-Gen ausgewählt.

Als Vertreter des Genotyps II sowie von Stämmen mit variierender Koloniemorphologie (Wechsel von DAP zu SNP) wurden Fr98/K8, Fr98/K8aM, Fr99/K11 und Fr00/K13 - K15 ausgewählt. *B. henselae* Fr98/K8 wurde bereits in ersten von PD Dr. Anna Sander

durchgeführten *in vivo*-Versuchen eingesetzt und aus diesem Grund auch bei den meisten Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendet. Im Verlauf dieser Arbeit konnte nach Infektion einer C57BL/6 Maus mit dem Stamm Fr98/K8 wiederum ein *B. henselae*-Stamm isoliert werden, der im Weiteren als Fr98/K8aM zum Einsatz kam. Fr99/K11 unterscheidet sich von den anderen verwendeten Stämmen durch das Fehlen einer Bande nach REP-PCR. Fr00/K13 - K15 stammen zwar aus Katzen eines Haushaltes, weisen jedoch eine unterschiedliche BadA-Expression auf und wurden aus diesem Grund ausgewählt.

Ebenfalls zum Genotyp II gehörend, jedoch stets in der DAP-Form wachsend, wurde *B. henselae* Fr02/K16 ausgewählt.

Eine Übersicht über die ermittelten Eigenschaften der *B. henselae*-Isolate, die in weiteren Versuchen verwendet wurden, sowie der Referenzstämmen gibt Tabelle 26.

Tabelle 26: Eigenschaften der im Weiteren verwendeten *B. henselae*-Isolate bzw. Referenzstämmen

<i>B. henselae</i> - Stamm	Koloniemorphologie und Wachstum		Genotyp	virB4 ⁻ -Gen			BadA – Ex- pression	Weitere Eigenschaften	Herkunft/Referenz
	Frühe Passagen	>25 Passagen		146-256	237-357	480-537			
Fr98/K8	DAP	SNP	II	++	++	++	++	Primärisolat	IMMH, vorliegende Arbeit
Fr98/K8aM	DAP	SNP	II	++	++	++	++	Isolat aus mit <i>B. henselae</i> Fr98/K8 infizierter Maus	vorliegende Arbeit
Fr97/K7	SNP	SNP	I	+	+	+	++	Primärisolat	IMMH, Sander et al. 1998
Fr99/K11	DAP	SNP	II	++	++	++	++	Primärisolat	IMMH, vorliegende Arbeit
Fr00/K13	DAP	SNP	II	++	++	++	++	Primärisolat	IMMH, vorliegende Arbeit
Fr00/K14	DAP	SNP	II	++	++	++	(+)	Primärisolat	IMMH, vorliegende Arbeit
Fr00/K15	DAP	SNP	II	++	++	++	(+)	Primärisolat	IMMH, vorliegende Arbeit
Fr02/K16	DAP	DAP	II	++	++	++	(+)	Primärisolat	IMMH, vorliegende Arbeit
ATCC 49882	DAP	SNP	I	++	++	++	-	Referenzstamm „Houston-1“	ATCC, Regnery et al. 1992
Marseille	DAP	DAP	II				++	Referenzstamm	K, Drancourt et al. 1996
Marseille BadA-	SNP	SNP	II				-	BadA-depletierte Mutante	K, Riess et al. 2004

DAP = *Slow-growing, Dry Agar-pitting* SNP = *Faster-growing, Smooth Non-agar-pitting* n.d.= nicht durchgeführt

IMMH: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Freiburg K: PD Dr. V. A. J. Kempf, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

4.2 Etablierung eines Mausmodells zur humanen Katzenkratzkrankheit (KKK)

In Anlehnung an die natürliche Infektion des Menschen mit *B. henselae* über die Haut und der Beschränkung der KKK im wesentlichen auf den drainierenden Lymphknoten wurde für die Etablierung des Mausmodells die subkutane Infektion von Mäusen in den Rücken der Hinterpfoten und damit der drainierende popliteale Lymphknoten als Zielorgan gewählt. Da Primärisolaten von *B. henselae* eine höhere Virulenz zugeschrieben wird als den bereits häufig passagierten Referenzstämmen (201), wurde zunächst der Stamm Fr98/K8, der in großer Menge auch in frühen Passagen im Labor vorhanden war, verwendet.

In ersten von PD Dr. Anna Sander durchgeführten Versuchen wurde anhand der Veränderung des Lymphknotengewichts und der Zellzahl auf eine für ein solches Modell geeignete Dosis von $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8 geschlossen (siehe Abbildung 8). Diese Dosierung wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls für die durchgeführten Infektionsversuche mit Bartonellen verwendet.

Die folgenden Untersuchungen wurden basierend auf klinischen, serologischen und histologischen Veränderungen bei der humanen KKK durchgeführt und ausgewertet.

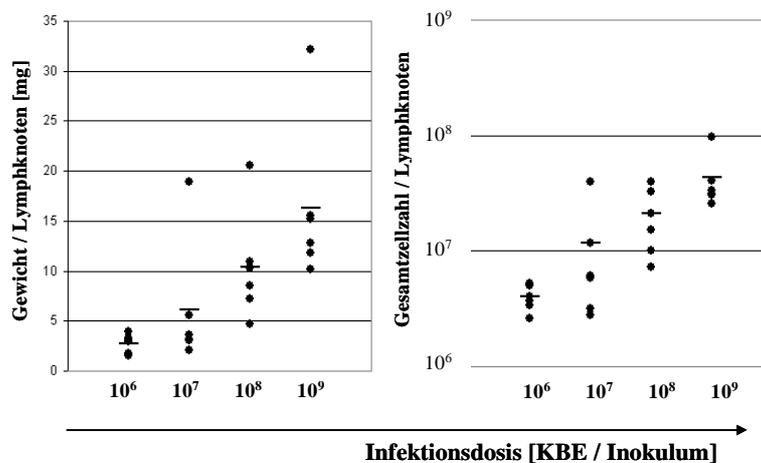


Abbildung 8 Titration der Infektionsdosis zur s.c. Infektion mit *B. henselae* Fr98/K8: Je 3 C57BL/6 Mäuse wurden mit 10^6 , 10^7 , 10^8 bzw. 10^9 KBE *B. henselae* Fr98/K8 s.c. in den Pfotenrücken der Hintergliedmaße infiziert. 14 Tage p.i. wurden Gewicht [mg] und Gesamtzellzahl der drainierenden poplitealen Lymphknoten bestimmt. — Mittelwert

4.2.1 Infektionsverlauf nach subkutaner Applikation von *B. henselae*, *B. grahamii* bzw. *B. quintana*

4.2.1.1 Allgemeinbefinden und Krankheitssymptome infizierter Tiere

Obwohl die meisten Patienten mit typischer KKK afebril und ohne systemische Störungen bleiben und nur in 5 bis 14% der Fälle schwerere Verlaufsformen mit Fieber, Kopfschmerzen, Muskel- und Gelenkschmerzen, Gewichtsverlust oder Symptomen einer atypischen KKK

auftreten (18, 43, 163), wurde nach s.c. Infektion von Mäusen mit Bartonellen auch aufgrund der hohen Infektionsdosis auf Hinweise für systemische Veränderungen geachtet. Die Mäuse wurden regelmäßig beobachtet in Hinblick auf Abweichungen in der Körperhaltung, im Verhalten, in Ernährungs- und Pflegezustand sowie auf Veränderungen an der Injektionsstelle.

In einem Zeitraum von vier Wochen nach Infektion entwickelten weder mit *B. henselae* noch mit *B. grahamii* ATCC 700132 oder *B. quintana* CIP103739 infizierte C57BL/6 Mäuse eine erkennbare Störung des Allgemeinbefindens.

An der Injektionsstelle von *B. henselae* entwickelte sich ab 2 - 3 Tagen p.i. eine Rötung und ödematöse Schwellung, die 1 - 2 Wochen p.i. am deutlichsten in Erscheinung trat und danach wieder abnahm bis hin zu einer nahezu unveränderten Pfote 3 - 4 Wochen p.i.. Hinsichtlich der Ausprägung dieser lokalen Umfangsvermehrung traten starke Schwankungen zwischen einzelnen Tieren eines Versuchs auf.

Mit *B. grahamii* ATCC 700132 oder *B. quintana* CIP103739 infizierte Mäuse entwickelten ebenfalls in den ersten zwei Wochen p.i. eine Rötung und ödematöse Schwellung an der Injektionsstelle. Die damit verbundene Umfangsvermehrung am Pfotenrücken war jedoch bei allen Tieren weniger ausgeprägt als nach Infektion mit *B. henselae*.

4.2.1.2 Veränderungen des drainierenden Lymphknotens

Gewicht und Zellzahl

Charakteristisch für die KKK des Menschen ist eine über mehrere Wochen bestehende, in ihrer Ausprägung variable, regionale Lymphknotenschwellung. Als Maß für eine Vergrößerung der drainierenden poplitealen Lymphknoten nach s.c. Infektion von adulten C57BL/6 Mäusen mit $\sim 10^8$ KBE Bartonellen wurde das Gewicht und die Gesamtzellzahl der Lymphknoten bestimmt.

Drei Wochen p.i. wiesen drainierende Lymphknoten nach s.c. Infektion mit Bartonellen im Vergleich zur Injektion von PBS ein erhöhtes Gewicht auf (siehe Abbildung 9). Nach Infektion mit *B. henselae* Fr98/K8 oder Fr98/K8aM lag das Gewicht eines Lymphknotens zwischen rund 5 mg und 32,5 mg (Mittelwert 18,05 mg bzw. 15,98 mg). Infektionen mit *B. quintana* bzw. *B. grahamii* führten im Vergleich dazu drei Wochen p.i. zu einer signifikant ($p \leq 0,001$) geringeren Zunahme des Lymphknotengewichts auf rund 3 - 10 mg und nur in Ausnahmefällen zu Gewichten bis 23,5 mg (Mittelwert 4,17 mg bzw. 7,95 mg) (siehe Abbildung 9).

Wie aus Abbildung 11 zu entnehmen, konnte eine langsame Zunahme des Lymphknotengewichts bis zur dritten Woche p.i. gefolgt von einer Persistenz bis zur fünften Woche p.i. beobachtet werden. Bis zur achten Woche p.i. wiesen einzelne Tiere noch vergrößerte Lymphknoten auf, ab neun Wochen p.i. waren alle untersuchten Lymphknoten nicht mehr auffällig vergrößert.

Diese Gewichtszunahme der drainierenden Lymphknoten ging einher mit einem deutlichen Anstieg der Gesamtzellzahl der Lymphknoten, der nach Infektion mit *B. henselae* deutlich stärker ausgeprägt war als nach Infektion mit *B. grahamii* (siehe Abbildung 10) oder *B. quintana* (Daten nicht gezeigt).

Histologie

Histopathologisch ist die KKK des Menschen in der Frühphase u.a. gekennzeichnet durch eine lymphoide Hyperplasie, später durch das Auftreten monozytoider, epitheloidzelliger Granulome, die mit der Zeit eine zentrale Nekrose und Ansammlung von neutrophilen Granulozyten aufweisen. Auffällig ist der hohe Anteil an B-Zellen in und um diese Granulome (81, 133, 134). Nach s.c. Infektion von Mäusen mit Bartonellen wurden von vergrößerten Lymphknoten (2. – 8. Woche p.i.) Gefrierschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Anhand dieser wurde eine akute Lymphadenitis mit folliculärer und lymphoider Hyperplasie und vereinzelt apoptotischen Zellkernen festgestellt (siehe Abbildung 12).

Zellkomposition

Die Zellkomposition des drainierenden Lymphknotens nach s.c. Infektion von Mäusen mit Bartonellen wurde 3 - 4 Wochen p.i. mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen verschiedene Zelloberflächenmoleküle (CD3, CD4, CD8a, CD19, B220, CD11c, CD11b, Gr1, DX5, NK1.1) durchflusszytometrisch untersucht.

Während sich der popliteale Lymphknoten nach Injektion von PBS aus rund 2/3 CD3⁺ Zellen und 1/3 CD19⁺ Zellen zusammensetzte, war die Zellkomposition der drainierenden Lymphknoten nach s.c. Infektion sowohl mit *B. henselae* Fr98/K8aM als auch *B. grahamii* ATCC 700132 von einer relativen Zunahme von B-Zellen (CD19⁺) auf im Mittel 44,44% bzw. 40,85% bei einer gleichzeitigen relativen Abnahme von T-Zellen (CD3⁺) auf im Mittel 46,06% bzw. 47,24% (siehe Abbildung 13, 14, 19, 24 und 25) gekennzeichnet.

Eine relative Zu- oder Abnahme anderer Zellpopulationen konnte nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 13 und 14).

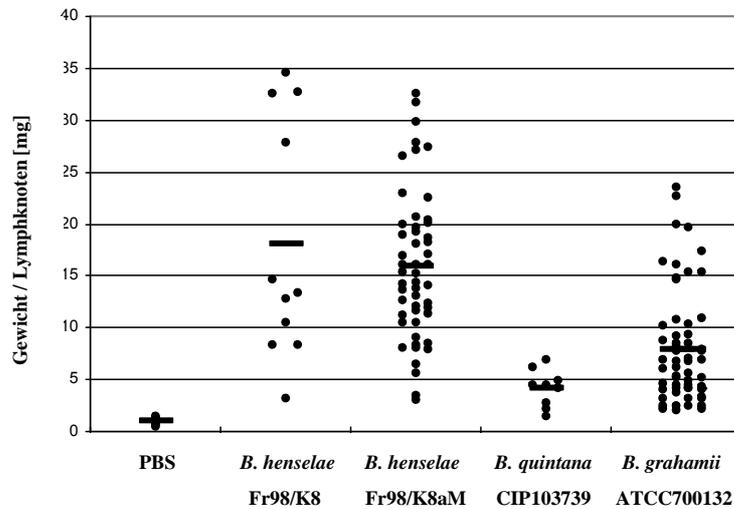


Abbildung 9 Gewicht der drainierenden Lymphknoten nach s.c. Infektion mit *B. henselae*, *B. quintana* und *B. grahamii*: C57BL/6 Mäuse wurden mit je $1-5 \times 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8, *B. henselae* Fr98/K8aM, *B. quintana* CIP103739 oder *B. grahamii* ATCC 700132 s.c. infiziert. Drei bis vier Wochen nach Infektion wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen und deren Gewicht [mg] bestimmt. Als Negativkontrolle sind die Gewichte drainierender poplitealer Lymphknoten nach Injektion von PBS angegeben. Dargestellt sind die Werte aus 3 (*B. henselae* Fr98/K8), 10 (*B. henselae* Fr98/K8aM), 2 (*B. quintana*) bzw. 8 (*B. grahamii*) unabhängigen Experimenten. • Gewicht eines Lymphknotens — Mittelwert

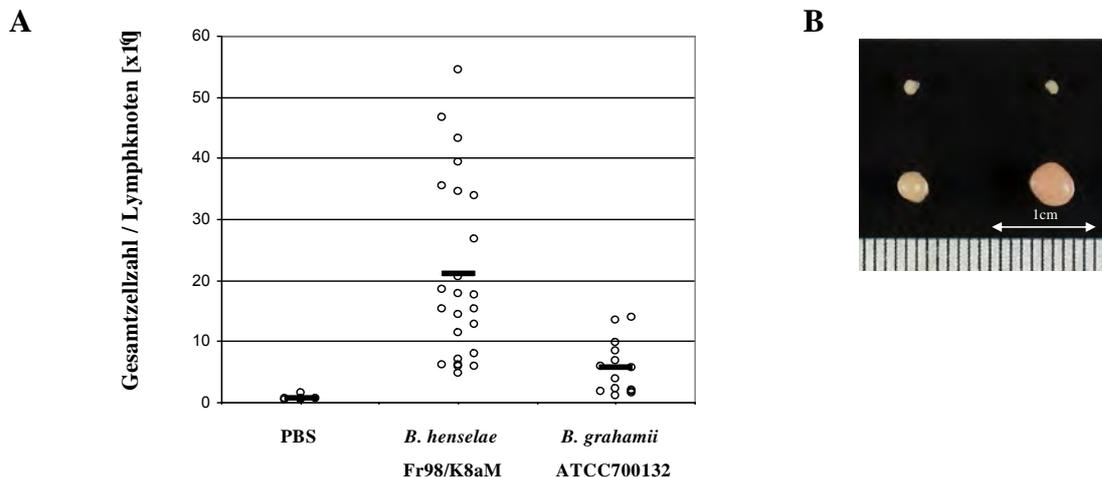


Abbildung 10 A. Gesamtzellzahl von drainierenden poplitealen Lymphknoten nach Infektion mit *B. henselae* bzw. *B. grahamii*: C57BL/6 Mäuse wurden mit je $1-5 \times 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 s.c. infiziert. Drei Wochen nach Infektion wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen und deren Gesamtzellzahl bestimmt. Als Negativkontrolle sind die Zellzahlen drainierender poplitealer Lymphknoten nach Injektion von PBS angegeben. Dargestellt sind Werte aus 9 (*B. henselae* Fr98/K8aM) bzw. 5 (*B. grahamii*) unabhängigen Experimenten.

• Gesamtzellzahl eines Lymphknotens — Mittelwert

B. Lymphknotengröße nach s.c. Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *B. henselae* Fr98/K8: 21 Tagen p.i. wurden die poplitealen Lymphknoten der nicht infizierten (Injektion von PBS; oben) und infizierten Seite (unten) entnommen und fotografiert.

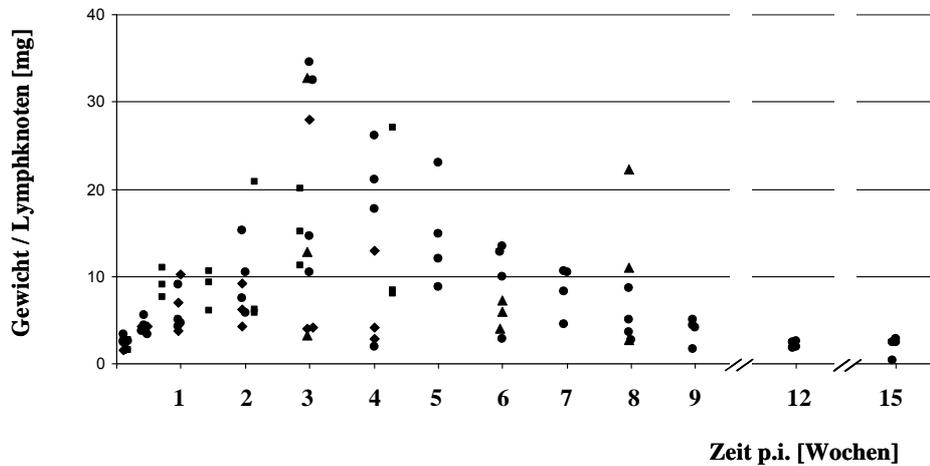


Abbildung 11 Veränderung des Gewichts drainierender Lymphknoten nach s.c. Infektion mit *B. henselae* Fr98/K8 in Abhängigkeit von der Zeit p.i.: Nach s.c. Infektion von C57BL/6 Mäusen mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion das Gewicht [mg] der drainierenden poplitealen Lymphknoten bestimmt. Die aus vier unabhängigen Experimenten erhaltenen Werte wurden in Abhängigkeit von der Zeit p.i. [Wochen] aufgetragen.

● Experiment 1 ▲ Experiment 2 ◆ Experiment 3 ■ Experiment 4

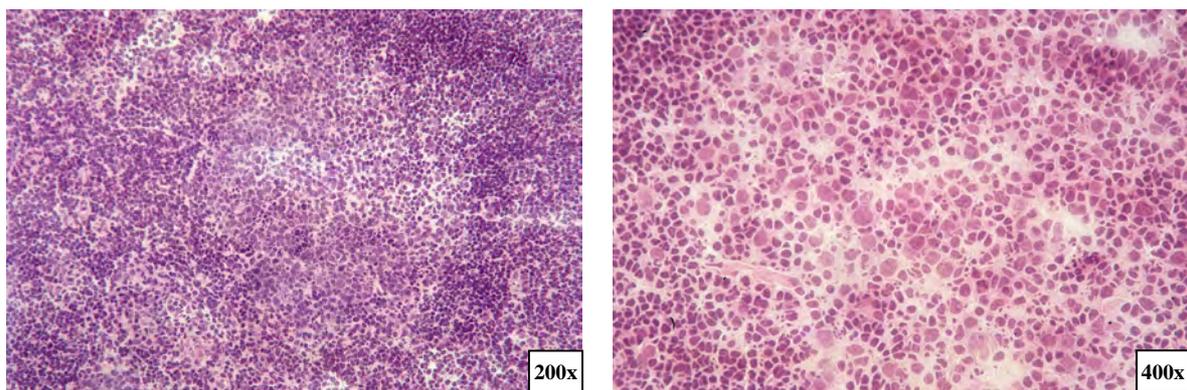


Abbildung 12 Gefrierschnitte drainierender Lymphknoten nach s.c. Infektion mit *B. henselae*: C57BL/6 Mäuse wurden mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8 infiziert und 3 - 7 Wochen p.i. die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen. Gefrierschnitte (5 μ m) dieser Lymphknoten wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbt und lichtmikroskopisch begutachtet. Dargestellt sind zwei repräsentative Schnitte.

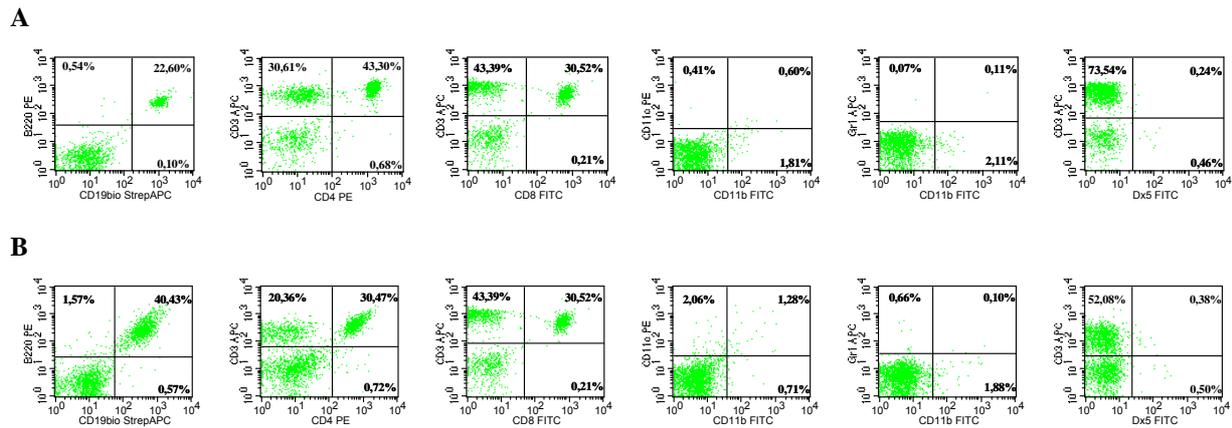


Abbildung 13 Zellkomposition drainierender Lymphknoten nach s.c. Infektion mit *B. henselae*: C57BL/6 Mäuse wurden mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8aM s.c. infiziert. Drei Wochen p.i. wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen und eine durchflusszytometrische Analyse der Zellkomposition anhand der Expression von CD19, B220, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, GR1 und DX5 lebender Zellen (Propidiumjodid negativ) durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten popliteale Lymphknoten naiver C57BL/6 Mäuse. Die Lage der Quadranten wurde durch Bezug auf die jeweilige Isotypenkontrolle bestimmt. **A.** Repräsentative Ergebnisse der Analyse mehrerer gepoolter poplitealer Lymphknoten naiver C57BL/6 Mäuse aus einer von drei durchgeführten Untersuchungen **B.** Repräsentative Ergebnisse des drainierenden poplitealen Lymphknotens drei Wochen p.i. einer mit *B. henselae* Fr98/K8aM s.c. infizierten Maus von sechs untersuchten Tieren aus zwei unabhängigen Experimenten.

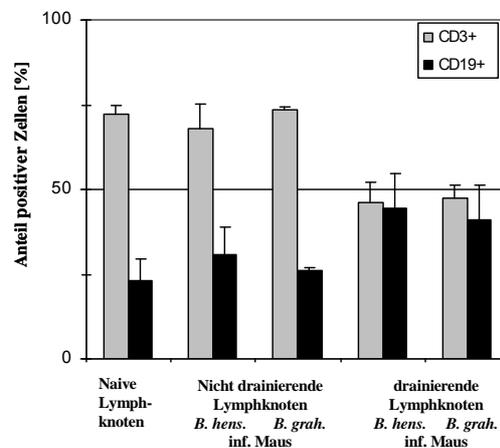


Abbildung 14 Relativer Anteil von T (CD3⁺) - und B (CD19⁺) -Zellen in drainierenden Lymphknoten nach s.c. Infektion mit *B. henselae* bzw. *B. grahamii*: C57BL/6 Mäuse wurden mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8aM bzw. *B. grahamii* ATCC 700132 s.c. in den linken Pfotenrücken der Hintergliedmaße infiziert. Drei Wochen p.i. wurden die drainierenden poplitealen sowie die poplitealen Lymphknoten der rechten Hintergliedmaße (nicht drainierend) entnommen und eine durchflusszytometrische Analyse der Zellkomposition anhand der CD3- und CD19 - Expression lebender Zellen (Propidiumjodid negativ) durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten zusätzlich popliteale Lymphknoten naiver C57BL/6 Mäuse (naive Lymphknoten). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung des jeweiligen prozentualen Anteils CD3⁺ bzw. CD19⁺ Zellen, bestimmt aus mindestens sechs Einzelwerten mehrerer unabhängiger Experimente.

4.2.1.3 Nachweis *B. henselae*-spezifischer Antikörper im Serum infizierter Mäuse

Die humanmedizinische Routinediagnostik der KKK basiert im Wesentlichen auf dem Nachweis hoher Titer *B. henselae*-spezifischer Antikörper im Patientenserum (2). Diese werden mittels indirektem Immunfluoreszenztest nachgewiesen, der analog auch für den quantitativen Nachweis von Antikörpern aus Serum infizierter Mäuse angewendet wurde. Rein qualitativ wurde das Serum infizierter Mäuse auch mit Hilfe eines Western-Immunoblots untersucht.

Im Serum der mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* infizierten C57BL/6 Mäuse konnten ab der dritten Woche hohe Titer ($\geq 1:512$) *B. henselae* spezifischer Immunglobuline (IgG) nachgewiesen werden. Diese hohen Titer bestanden auch bei bereits mehrere Wochen infizierten Tieren, erst ab der 15. – 20. Woche p.i. nahmen die gemessenen Titer ab (siehe Abbildung 15).

Auch mittels Western-Immunoblot konnte bei allen mit *B. henselae* infizierten Tieren spätestens 3 Wochen p.i. im Serum *B. henselae*-spezifisches IgG nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

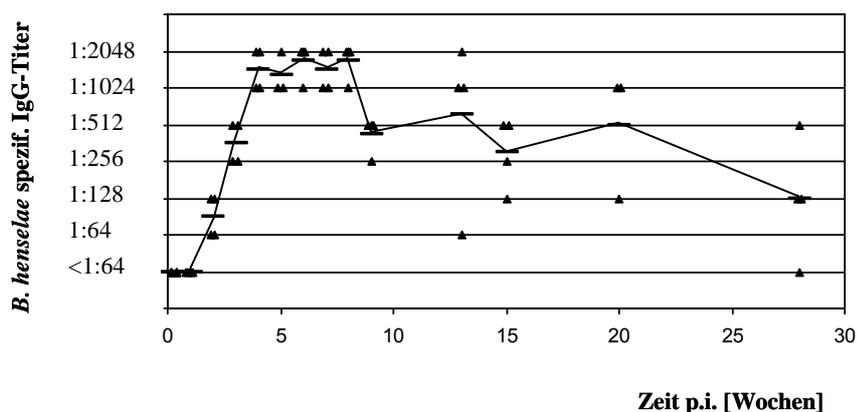


Abbildung 15 *B. henselae* spezifische Immunglobulin G (IgG)-Titer im Serum infizierter Mäuse: C57BL/6 Mäuse wurden mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8 s.c. infiziert. Im wöchentlichen Abstand wurden 3 - 4 Tiere zur Gewinnung von Serum aus dem Versuch genommen und der Titer an *B. henselae* spezifischem IgG mittels Immunfluoreszenztest ermittelt. — Mittelwert

4.2.1.4 Nachweis von Bartonellen in infizierten Mäusen

Der Nachweis von Bartonellen aus infizierten Tieren erfolgte über das Anlegen von Kulturen aus Lymphknoten, Blut, Milz, Leber, Knochenmark und Injektionsstelle sowie über den Nachweis Bartonellen-spezifischer DNA aus diesen Proben zu verschiedenen Zeitpunkten p.i.. Im Falle der KKK des Menschen gelingt die Anzucht von *B. henselae* nur in wenigen Fällen; die höchste Rate mit 20,5% berichteten Fournier et al. (88). Der Nachweis von Bartonellen-DNA zur Diagnose der humanen KKK weist je nach Studie, Zielgen und

verwendeten Primerpaaren eine Sensitivität von 43-100% auf. Eine Gemeinsamkeit ist der nur in den ersten Wochen nach Beginn der Erkrankung positive DNA-Nachweis (2). In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis Bartonellen-spezifischer DNA durch Amplifikation einer 195 bp langen Sequenz des RiboflavinC-Gens und Detektion des Produkts mittels einer spezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonde in einer real-time PCR.

Anzucht von *B. henselae* Fr98/K8 bzw. K8aM

Eine Rekultivierung von *B. henselae* Fr98/K8 aus dem Gewebe infizierter C57BL/6 Mäuse war nur wenige Tage p.i. möglich. Beispielhaft hierfür sind in Tabelle 27 die Ergebnisse eines von mehreren Experimenten dargestellt. Zusammenfassend konnte *B. henselae* Fr98/K8 ein Tag p.i. regelmäßig aus der Injektionsstelle sowie dem drainierenden poplitealen Lymphknoten angezüchtet werden. Bis zu drei Tage p.i. war vereinzelt aus der Injektionsstelle, drainierenden poplitealen und inguinalen Lymphknoten und/oder aus der Milz eine Anzucht möglich. Während der Entwicklung der Lymphknotenvergrößerung (7 - 21 Tage p.i.) konnte nur aus einer von mehr als zwanzig untersuchten Mäusen in mindestens drei unabhängigen Experimenten *B. henselae* Fr98/K8 angezüchtet werden. Zu späteren Zeitpunkten p.i. (3 bis 4, 6 und 8 Wochen p.i.) war keine Anzucht von *B. henselae* Fr98/K8 oder Fr98/K8aM aus den drainierenden Lymphknoten möglich. Blut, Leber oder Knochenmark der infizierten Mäuse waren zu allen untersuchten Zeitpunkten kulturell negativ.

Einzigster Hinweis für eine mögliche systemische Infektion war die Isolation von 179 KBE *B. henselae* aus einem Drittel der Milz einer Maus 21 Tage nach Infektion mit *B. henselae* Fr98/K8. Dieses Tier wies ein ungestörtes Allgemeinbefinden auf, das Gewicht des drainierenden Lymphknotens betrug 3,2 mg (entsprechende Lymphknoten der gleichzeitig infizierten und untersuchten Tiere wogen 12,8 mg und 32,7 mg). Der Nachweis von Bartonellen-spezifischer DNA fiel in einem weiteren Milzdrittel jener Maus negativ, im drainierenden Lymphknoten schwach positiv aus. Nach weiterer Subkultivierung wurden die isolierten Bakterien anhand eines Gram-Präparates sowie verschiedener PCR-Methoden (siehe auch Kapitel 4.1.3 und 4.1.4) als *B. henselae* identifiziert und für weitere Versuche unter dem Namen *B. henselae* Fr98/K8aM verwendet.

DNA-Nachweis nach Infektion mit *B. henselae* Fr98/K8 bzw. K8aM

Mittels PCR war es möglich, Bartonellen-spezifische DNA im drainierenden Lymphknoten mit *B. henselae* Fr98/K8 oder Fr98/K8aM infizierter Tiere bis zu sieben Tage p.i. regelmäßig nachzuweisen. Entsprechend den Rekultivierungsergebnissen konnte in Milzgewebe einzelner infizierter Tiere an Tag 1 und Tag 3 p.i. ebenfalls Bartonellen-spezifische DNA detektiert werden. An Tag 21 p.i. war der Nachweis von Bartonellen-spezifischer DNA im

drainierenden Lymphknoten bei sechs von zwölf untersuchten Tieren aus 5 verschiedenen Experimenten positiv. Zum selben Zeitpunkt wurde in Blut, Leber und Milz lediglich bei einem von vierzehn Tieren und in Leber und Milz bei fünf von achtzehn Tieren aus 5 verschiedenen Experimenten Bartonellen-spezifische DNA gefunden (siehe auch Tabelle 27).

<i>B. henselae</i> Fr98/K8		1 d p.i.	3 d p.i.	7 d p.i.	14 d p.i.	21 d p.i.	28 d p.i.
		Positives Ergebnis / untersuchte Mäuse					
Injektionsstelle	<i>Anzucht</i>	3 / 3	1 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Poplitealer Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	2 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	2 / 3	3 / 3	3 / 3	1 / 3	2 / 3	1 / 3
Inguinaler Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Milz	<i>Anzucht</i>	1 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	1 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	1 / 3	0 / 3
Leber	<i>Anzucht</i>	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	1 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	1 / 3	0 / 3
Blut	<i>Anzucht</i>	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	1 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	1 / 3	0 / 3

Tabelle 27 Erregernachweis aus Organen mit *B. henselae* Fr98/K8 infizierter Mäuse: C57BL/6 Mäuse wurden s.c. mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8 infiziert und jeweils drei Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. analysiert. Hierzu wurden Kulturen von Proben der Injektionsstelle, drainierenden Lymphknoten, Milz, Leber und Blut angelegt und für mind. drei Wochen inkubiert. Der Nachweis spezifischer DNA erfolgt über die Amplifikation einer Sequenz des RibC-Gens in einer real-time PCR. Angegeben sind jeweils die Anzahl der positiven Erregernachweise über Anzucht bzw. DNA-Nachweis je Anzahl der untersuchten Tiere eines repräsentativen Experiments von mehreren durchgeführten.

Anzucht von *B. grahamii* ATCC 700132 bzw. *B. quintana* CIP 103739 (siehe Tabelle 28 und 29)

Die Möglichkeit einer Reisolation der Erreger aus Lymphknoten, Milz, Leber und Blut infizierter Tiere wurde jeweils zu den Zeitpunkten 1, 9-10, 20-21 bzw. 28 Tage p.i. in zwei unabhängigen Experimenten untersucht. Hierbei konnte *B. grahamii* einen Tag p.i. aus den drainierenden poplitealen Lymphknoten aller sechs, aus den Milzen von fünf der sechs sowie aus der Leber von einem der sechs untersuchten Tiere rekultiviert werden. Weiterhin war eine Anzucht an Tag 9 p.i. aus zwei von sechs untersuchten Milzen und an Tag 21 aus dem Blut eines von sechs Tieren möglich. *B. quintana* konnte einen Tag p.i. ebenfalls aus den drainierenden poplitealen Lymphknoten aller sechs, den Milzen von fünf der sechs sowie dem Blut eines der sechs untersuchten Tiere angezüchtet werden. An Tag 9-10 p.i. war die Anzucht von *B. quintana* aus einer von sechs entnommenen Milzen möglich.

DNA-Nachweis nach Infektion mit *B. grahamii* ATCC 700132 bzw. *B. quintana* CIP 103739 (siehe Tabelle 28 und 29)

Zum Nachweis Bartonellen-spezifischer DNA in Lymphknoten, Milz, Leber und Blut infizierter Tiere wurden jeweils zu den Zeitpunkten 1, 9-10, 20-21, bzw. 28 Tage p.i. Proben genommen. Ein Tag p.i. konnte in Proben von allen untersuchten Gewebearten sowohl mit *B.*

grahamii als auch mit *B. quintana* infizierter Mäuse Bartonellen-spezifische DNA detektiert werden. In drainierenden Lymphknoten, Milz und Blut *B. grahamii*-infizierter Tiere konnte an Tag 9 p.i., im drainierenden Lymphknoten bei einer Maus auch an Tag 21 p.i. Bartonellen-spezifische DNA nachgewiesen werden. Proben aus drainierenden Lymphknoten und Leber von *B. quintana* infizierten Mäusen lieferten vereinzelt bis Tag 28 bzw. 21 p.i. eine positives Signal für Bartonellen-spezifische DNA (siehe auch Tabellen 28 und 29).

<i>B. grahamii</i> ATCC 700132		1 d p.i.	9 d p.i.	21 d p.i.	28 d p.i.
		Positives Ergebnis / untersuchte Mäuse			
Poplitealer Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	6 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	4 / 6	3 / 6	0 / 6	0 / 3
Inguinaler Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	2 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	3 / 6	3 / 6	1 / 6	0 / 3
Milz	<i>Anzucht</i>	5 / 6	2 / 6	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	3 / 6	1 / 6	0 / 6	0 / 3
Leber	<i>Anzucht</i>	1 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	4 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 3
Blut	<i>Anzucht</i>	0 / 6	0 / 6	1 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	3 / 6	3 / 6	0 / 6	0 / 3

Tabelle 28 Erregerachweis aus Organen mit *B. grahamii* infizierter Mäuse: C57BL/6 Mäuse wurden s.c. mit *B. grahamii* ATCC 700132 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. analysiert. Hierzu wurden Kulturen von drainierenden Lymphknoten, Milz, Leber und Blut angelegt und für mind. drei Wochen inkubiert. Der Nachweis spezifischer DNA erfolgt über die Amplifikation einer Sequenz des RibC-Gens in einer real-time PCR. Angegeben sind jeweils die Anzahl der positiven Erregerachweise über Anzucht bzw. DNA-Nachweis je Anzahl der untersuchten Tiere aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten (Infektionsdosis $\sim 10^8$ bzw. $\sim 10^9$ KBE).

<i>B. quintana</i> CIP 103739		1 d p.i.	9/10 d p.i.	20/21 d p.i.	28 d p.i.
		Positives Ergebnis / untersuchte Mäuse			
Poplitealer Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	6 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	6 / 6	6 / 6	1 / 6	1 / 3
Inguinaler Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	1 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	3 / 6	4 / 6	0 / 6	0 / 3
Milz	<i>Anzucht</i>	5 / 6	1 / 6	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	4 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 3
Leber	<i>Anzucht</i>	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	4 / 6	2 / 6	2 / 6	0 / 3
Blut	<i>Anzucht</i>	1 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	5 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 3

Tabelle 29 Erregerachweis aus Organen mit *B. quintana* infizierter Mäuse: C57BL/6 Mäuse wurden s.c. mit *B. quintana* CIP 103739 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. analysiert. Hierzu wurden Kulturen von drainierenden Lymphknoten, Milz, Leber und Blut angelegt und für mind. drei Wochen inkubiert. Der Nachweis spezifischer DNA erfolgt über die Amplifikation einer Sequenz des RibC-Gens in einer real-time PCR. Angegeben sind jeweils die Anzahl der positiven Erregerachweise über Anzucht bzw. DNA-Nachweis je Anzahl der untersuchten Tiere aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten (Infektionsdosis $\sim 10^8$ bzw. $\sim 10^{10}$ KBE).

4.2.2 Elimination von *B. henselae* in immundefizienten Mausstämmen

Im humanen System ist eine Anzucht von *B. henselae* aus immunkompetenten Patienten mit KKK nur selten erfolgreich (88), wohingegen in immundefizienten Patienten mit vasoproliferativen Veränderungen häufig eine Bakteriämie nachweisbar ist. Im Zusammenhang mit der nach Infektion von immunkompetenten Mäusen beobachteten raschen Elimination der Bakterien und der sich trotzdem entwickelnden Lymphadenopathie stellte sich die Frage nach Erregerkontrolle und Veränderungen in immundefizienten Mausstämmen nach Infektion mit *B. henselae*.

Aus diesem Grund wurden folgende vier Mausstämme ausgewählt: C57BL/6 gp91phox^{-/-}, C57BL/6 iNOS^{-/-}, C57BL/6 RAG1^{-/-}, BALB/c CD1^{-/-}.

Gp91phox^{-/-}-Mäuse weisen einen Defekt der gp91-Untereinheit der phagozytären NADPH-Oxidase auf. Diese Mäuse können folglich keine reaktiven Sauerstoffmoleküle im Rahmen eines *Oxidative Burst* bilden. Die Bedeutung dieses Vorgangs ist für die Abwehr anderer intrazellulärer Mikroorganismen beschrieben (27, 71, 165). iNOS^{-/-} Mäuse besitzen einen Defekt in der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die über einen längeren Zeitraum große Mengen an NO freisetzen kann. Im Immunsystem kann NO u.a. zum Schutz vor intrazellulären Mikroorganismen beitragen. Im Kontext mit Bartonellen wurde eine Beteiligung von NO an der Abtötung von *B. henselae in vitro* beobachtet (182). Bei der KKK konnte eine Expression von iNOS immunhistologisch in Granulomen veränderter Lymphknoten festgestellt werden (82). RAG1^{-/-} Mäuse produzieren keine reifen B- und T-Zellen, da sie einen Defekt der Rekombinase 1 aufweisen und so keine V(D)J Rekombination von T-Zell-Rezeptor und Immunglobulinen durchführen können. Phänotypisch weisen diese Mäuse einen schwerwiegenden Defekt der erworbenen Immunität auf, der auch als „*Non-leaky*“ *Severe Combined Immune Deficiency* (SCID) bezeichnet wird (175). CD1^{-/-} Mäusen hingegen fehlen aufgrund des deletierten CD1-Gens funktionsfähige NKT-Zellen (232), die v.a. Glykolipidantigene erkennen und denen durch die Freisetzung von Zytokinen eine Rolle bei der Regulation der Immunantwort u.a. bei antimikrobiellen und autoimmunen Prozessen zukommt (94).

Analog zu den Versuchen mit Wildtyp-Mäusen wurden auch die immundefizienten Mäusen s.c. mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8 oder Fr98/K8aM in den Rücken der Hinterpfoten infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. wurden sie hinsichtlich einer Vergrößerung der drainierenden Lymphknoten sowie des Vorhandenseins von Bakterien (Kultur) bzw. Bakterien-DNA (PCR) analysiert.

Eine Anzucht von *B. henselae* aus infizierten immundefizienten Tieren war unabhängig vom jeweiligen Immundefekt nur in den ersten 1 - 3 Tagen p.i. aus der Injektionsstelle, den drainierenden Lymphknoten und der Milz möglich. Der Nachweis von Bartonellen-spezifischer DNA aus Gewebe immundefizienter Mäuse gelang bis zu drei Wochen p.i. bei einzelnen Tieren aus den drainierenden Lymphknoten. Signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Immundefekten traten nicht auf. Der Nachweis von Bartonellen-DNA aus anderen Organen gelang lediglich bei zwei iNOS^{-/-} Mäusen (eine Maus 1 Tag p.i. in Milz und Leber, eine Maus 21 Tage p.i. in Leber) sowie bei einigen RAG1^{-/-} Mäusen (zwei Tiere 1 Tag p.i. in Milz und Leber, eines davon zusätzlich in Blut; ein Tier 1 Tag p.i. nur in Blut; ein Tier in Leber 3 Tage p.i.; ein Tier in Milz und Leber 10 Tage p.i.; zwei Tiere in Milz 21 Tage p.i.) (siehe Tabellen 30, 31, 32, 33).

C57BL/6 gp91phox^{-/-} und C57BL/6 iNOS^{-/-} Mäuse wiesen drei Wochen p.i. eine deutliche, BALB/c CD1^{-/-} eine etwas schwächer ausgeprägte Vergrößerung der drainierenden Lymphknoten auf. C57BL/6 RAG1^{-/-} Tiere entwickelten keine Vergrößerung der drainierenden Lymphknoten nach s.c. Infektion mit *B. henselae* Fr98/K8 (siehe Abbildung 16).

Somit waren auch die untersuchten immundefizienten Mausstämme zur Erregerkontrolle fähig und entwickelten mit Ausnahme der B- und T-Zell-defizienten Tiere (RAG1^{-/-}) eine Lymphadenopathie.

C57BL/6 gp91 phox ^{-/-} <i>B. henselae</i> Fr98/K8		0,4/1 d p.i.	2/3 d p.i.	7 d p.i.	14 d p.i.	21 d p.i.	28 d p.i.
		Positives Ergebnis / untersuchte Mäuse					
Injektionsstelle	<i>Anzucht</i>	3 / 3	2 / 3	0 / 3	0 / 5	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	3 / 3	3 / 3	2 / 3	2 / 3	2 / 3	0 / 3
Poplitealer Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	5 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 5	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	3 / 3	3 / 3	2 / 3	2 / 3	2 / 3	0 / 3
Inguinaler Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	1 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 5	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	3 / 3	2 / 3	3 / 3	1 / 3	1 / 3	0 / 3
Milz	<i>Anzucht</i>	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 5	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Leber	<i>Anzucht</i>	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 5	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Blut	<i>Anzucht</i>	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 5	0 / 6	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3

Tabelle 30 Erregernachweis aus Organen mit *B. henselae* Fr98/K8 infizierter gp91phox^{-/-}-Mäuse: C57BL/6 gp91phox^{-/-} Mäuse wurden s.c. mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. analysiert. Hierbei wurden Kulturen von drainierenden Lymphknoten, Milz, Leber und Blut angelegt und für mind. drei Wochen inkubiert. Der Nachweis spezifischer DNA erfolgt über die Amplifikation einer Sequenz des RibC-Gens in einer real-time PCR. Angegeben sind jeweils die Anzahl der positiven Erregernachweise über Anzucht bzw. DNA-Nachweis je Anzahl der untersuchten Tiere aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

C57BL/6 iNOS -/- <i>B. henselae</i> Fr98/K8		0,4 d p.i.	2 d p.i.	10 d p.i.	21 d p.i.
		Positives Ergebnis / untersuchte Mäuse			
Poplitealer Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	3 / 3	0 / 3	0 / 2	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	3 / 3	3 / 3	0 / 2	1 / 3
Inguinaler Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	0 / 3	0 / 3	0 / 2	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	1 / 3	0 / 3	0 / 3	2 / 3
Milz	<i>Anzucht</i>	1 / 3	0 / 3	0 / 2	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	1 / 3	0 / 3	0 / 2	3 / 3
Leber	<i>Anzucht</i>	0 / 3	0 / 3	0 / 2	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	1 / 3	0 / 3	0 / 2	1 / 3
Blut	<i>Anzucht</i>	0 / 3	0 / 3	0 / 2	0 / 3
	<i>DNA-Nachweis</i>	0 / 3	0 / 3	0 / 2	0 / 3

Tabelle 31 Erregernachweis aus Organen mit *B. henselae* Fr98/K8 infizierter iNOS-/-Mäuse: C57BL/6 iNOS-/- Mäuse wurden s.c. mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. analysiert. Hierbei wurden Kulturen von drainierenden Lymphknoten, Milz, Leber und Blut angelegt und für mind. drei Wochen inkubiert. Der Nachweis spezifischer DNA erfolgt über die Amplifikation einer Sequenz des RibC-Gens in einer real-time PCR. Angegeben sind jeweils die Anzahl der positiven Erregernachweise über Anzucht bzw. DNA-Nachweis je Anzahl der untersuchten Tiere eines Experiments.

C57BL/6 RAG1 -/- <i>B. henselae</i> Fr98/K8 bzw. K8aM		1 d p.i.	3 d p.i.	10 d p.i.	21 d p.i.
		Positives Ergebnis / untersuchte Mäuse			
Injektionsstelle	<i>Anzucht</i>	2 / 2	2 / 3	0 / 3	0 / 3
Poplitealer Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	5 / 5	0 / 3	0 / 3	0 / 5
	<i>DNA-Nachweis</i>	3 / 3	2 / 3	1 / 3	0 / 5
Inguinaler Lymphknoten	<i>Anzucht</i>	0 / 5	0 / 3	0 / 3	0 / 5
	<i>DNA-Nachweis</i>	0 / 3	1 / 3	0 / 3	0 / 5
Milz	<i>Anzucht</i>	1 / 5	0 / 3	0 / 3	0 / 5
	<i>DNA-Nachweis</i>	2 / 5	0 / 3	1 / 3	2 / 5
Leber	<i>Anzucht</i>	0 / 5	0 / 3	0 / 3	0 / 5
	<i>DNA-Nachweis</i>	2 / 5	1 / 3	1 / 3	0 / 5
Blut	<i>Anzucht</i>	0 / 5	0 / 3	0 / 3	0 / 5
	<i>DNA-Nachweis</i>	2 / 5	0 / 3	0 / 3	0 / 5

Tabelle 32 Erregernachweis aus Organen mit *B. henselae* Fr98/K8 infizierter RAG1 -/-Mäuse: C57BL/6 RAG1-/- Mäuse wurden s.c. mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8 bzw. K8aM infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. analysiert. Hierbei wurden Kulturen von drainierenden Lymphknoten, Milz, Leber und Blut angelegt und für mind. drei Wochen inkubiert. Der Nachweis spezifischer DNA erfolgt über die Amplifikation einer Sequenz des RibC-Gens in einer real-time PCR. Angegeben sind jeweils die Anzahl der positiven Erregernachweise über Anzucht bzw. DNA-Nachweis je Anzahl der untersuchten Tiere aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

BALB/c CD1 -/- <i>B. henselae</i> Fr98/K8aM		7/8 d p.i.	21/22 d p.i.
		Positives untersuchte Proben	Ergebnis /
Injektionsstelle	Anzucht	0 / 6	0 / 6
Poplitealer Lymphknoten	Anzucht	0 / 6	0 / 2
Inguinaler Lymphknoten	Anzucht	0 / 6	0 / 2
Milz	Anzucht	0 / 4	0 / 4
Leber	Anzucht	0 / 4	0 / 4
Blut	Anzucht	0 / 4	0 / 4
Knochenmark	Anzucht	0 / 4	0 / 4

Tabelle 33 Erregernachweis aus Organen mit *B. henselae* Fr98/K8 infizierter CD1 -/-Mäuse: BALB/c CD1 -/- Mäuse wurden s.c. mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8aM infiziert und 1 bzw. 3 Wochen p.i. analysiert. Hierbei wurden Kulturen von drainierenden Lymphknoten, Milz, Leber, Blut und Knochenmark angelegt und für mind. drei Wochen inkubiert. Angegeben sind jeweils die Anzahl der positiven Erregernachweise über Anzucht je Anzahl der untersuchten Gewebeproben aus einem Experiment.

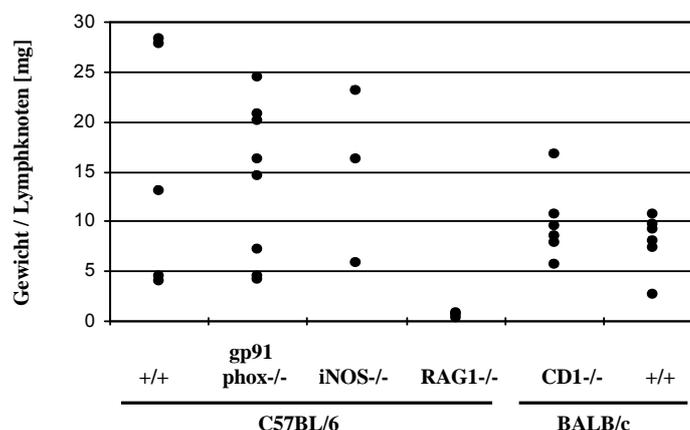


Abbildung 16 Gewicht der drainierenden Lymphknoten nach s.c. Infektion immundefizienter Mausstämmen mit *B. henselae*: Gp91phox, iNOS, RAG1 und CD1 defiziente Mäuse sowie die entsprechenden Wildtypmausstämme wurden mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8 (C57BL/6) bzw. Fr98/K8aM (BALB/c) s.c. infiziert. Drei Wochen nach Infektion wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen und deren Gewicht [mg] bestimmt. Die hier dargestellten Werte wurden gleichzeitig mit den in den Tabellen 30-33 aufgeführten Ergebnissen zum Nachweis von *Bartonellen* aus Organen infizierter Tiere ermittelt.

4.2.3 Veränderungen des drainierenden Lymphknotens nach Injektion inaktivierter *B. henselae*

Da die *B. henselae*-induzierte Lymphadenopathie sowohl in immunkompetenten als auch in immundefizienten Tieren zu Zeitpunkten nachweisbar war, an welchen der kulturelle Erregernachweis regelmäßig negativ verlief, stellte sich die Frage nach der prinzipiellen Notwendigkeit lebender Bakterien für die Entwicklung der Lymphadenopathie. Aus diesem Grund wurden C57BL/6 Mäuse mit inaktivierten *B. henselae* in einer Dosierung von vormals

$\sim 10^8$ KBE injiziert. Hierzu wurden die Bakterien entweder durch Ultraschallbehandlung lysiert oder durch mehrminütiges Kochen denaturiert.

Mit beiden Methoden konnte drei Wochen nach Inokulation eine deutliche Vergrößerung des drainierenden Lymphknotens beobachtet werden (siehe Abbildung 17). Eine Persistenz der Lymphadenopathie nach s.c. Injektion ultraschallbehandelter *B. henselae* Fr98/K8 - gemessen an der Zunahme des Lymphknotengewichts – konnte in einem Experiment über mehrere Wochen verfolgt werden (siehe Abbildung 18).

Die zelluläre Komposition der drainierenden Lymphknoten wies eine relative Zunahme der B-Zellen (CD19⁺) bei einer relativen Abnahme der T-Zellen (CD3⁺) auf (siehe Abbildung 19). Eine Veränderung des Anteils CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen an CD3⁺ Zellen trat nicht auf.

Eine Lymphadenopathie konnte somit auch nach Injektion inaktivierter *B. henselae* beobachtet werden.

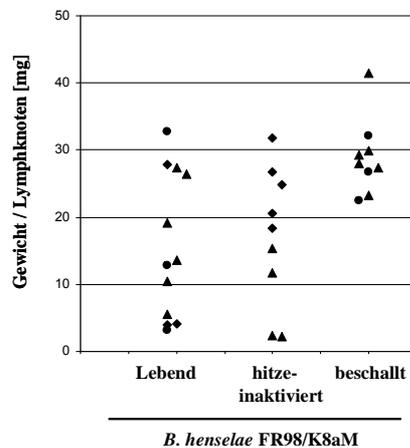


Abbildung 17 Gewicht der drainierenden Lymphknoten nach s.c. Applikation inaktivierter *B. henselae*: C57BL/6 Mäusen wurde entweder $\sim 10^8$ KBE lebende *B. henselae* Fr98/K8aM oder selbige Bakterien nach deren Inaktivierung durch Hitze bzw. Ultraschallbehandlung s.c. appliziert. Drei Wochen nach Stimulation wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen und das Gewicht bestimmt [mg]. Dargestellt sind die Werte aus insgesamt drei Experimenten. ● Experiment 1 ▲ Experiment 2 ■ Experiment 3

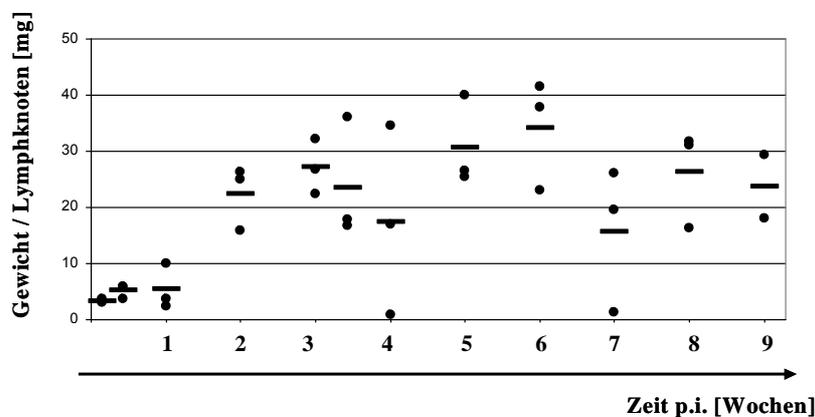


Abbildung 18 Veränderung des Gewichts drainierender Lymphknoten nach s.c. Applikation inaktivierter *B. henselae* Fr98/K8 in Abhängigkeit von der Zeit p.i.: C57BL/6 Mäusen wurde durch Ultraschallbehandlung inaktivierte *B. henselae* Fr98/K8 (vormals $\sim 10^8$ KBE) s.c. appliziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten p.s. (zwischen einem Tag und neun Wochen) wurde das Gewicht [mg] der drainierenden poplitealen Lymphknoten von jeweils drei Tieren bestimmt. — Mittelwert

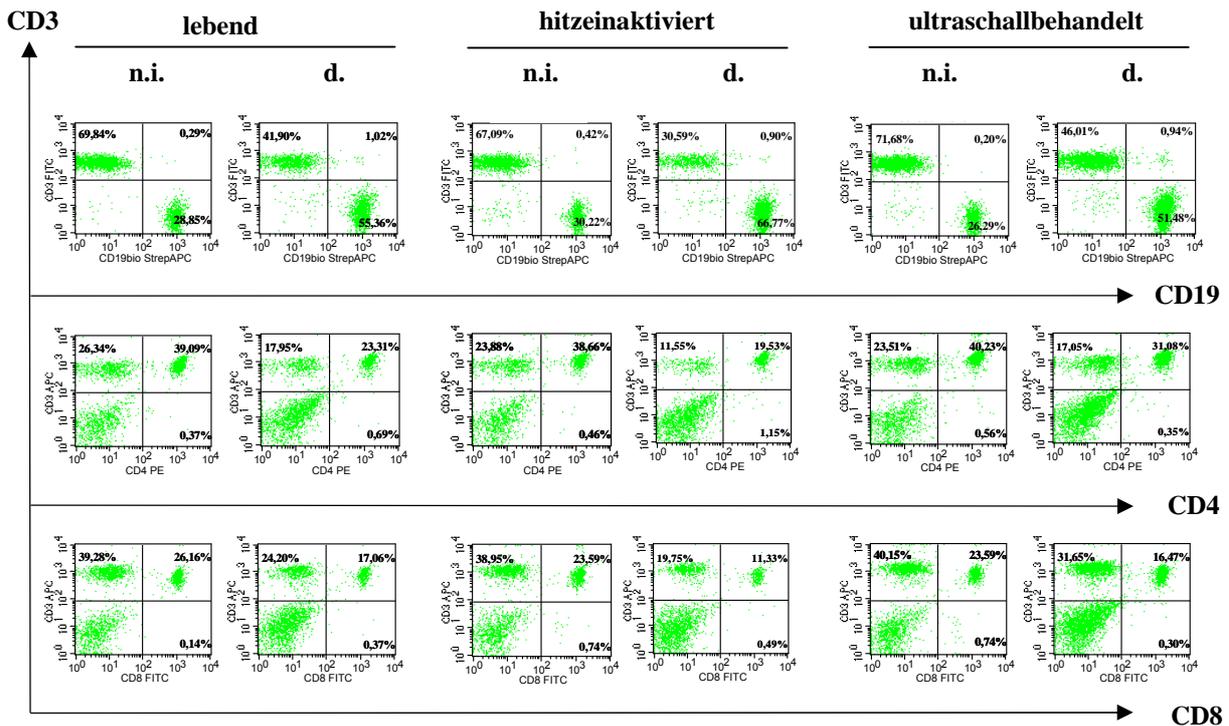


Abbildung 19 Zellkomposition drainierender Lymphknoten nach s.c. Injektion inaktiverter *B. henselae*: C57BL/6 Mäuse wurden mit $\sim 10^8$ KBE lebenden *B. henselae* Fr98/K8aM bzw. mit selbigem Inokulum nach Inaktivierung durch Kochen oder Ultraschallbehandlung s.c. stimuliert. Drei Wochen p.i. wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten sowie die poplitealen Lymphknoten der unbehandelten Seite entnommen und eine durchflusszytometrische Analyse der Zellkomposition anhand der Expression von CD3, CD19, CD4 und CD8 lebender Zellen (Propidiumjodid negativ) durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse eines von je vier analysierten Lymphknoten.
d.: drainierender poplitealer Lymphknoten n.i.: poplitealer Lymphknoten der nicht injizierten Seite

4.2.4 Einfluß von *B. henselae*-Genotyp oder -Isolat auf die Entwicklung der Lymphadenopathie

Wie bereits in Kapitel 4.1. ausgeführt ist die Spezies *B. henselae* nicht homogen sondern weist genotypisch und phänotypisch Unterschiede auf. Aus den in Kapitel 4.1 charakterisierten Isolaten wurden deswegen aufgrund ihrer Genotypzugehörigkeit, ihrer Wachstumseigenschaften, verschiedener DNA-Fingerprint-Methoden sowie der Expression von BadA mehrere Isolate für *in vivo*-Versuche ausgewählt (Kapitel 4.1.6.). Im Folgenden wurde die Abhängigkeit der Entwicklung der oben beschriebenen Lymphadenopathie vom verwendeten *B. henselae*-Isolat untersucht. C57BL/6 Mäuse wurden hierzu mit jeweils $\sim 10^8$ KBE lebenden Bakterien des jeweiligen Isolats s.c. in den Rücken der Hinterpfoten injiziert und drei Wochen p.i. das Lymphknotengewicht bestimmt sowie Kulturen angelegt.

Es konnte hierbei bei allen eingesetzten Stämmen eine Lymphknotenvergrößerung beobachtet werden, unabhängig vom Genotyp des Erregers (siehe Abbildung 20 und Abbildung 9). Die

Ausprägung der Lymphadenopathie zeigte Varianzen zwischen einzelnen Stämmen, die jedoch aufgrund der zu geringen Tier- und Versuchszahl nicht signifikant sind.

Eine Anzucht der Erreger aus der Injektionsstelle, den drainierenden Lymphknoten, Milz, Leber oder Blut war bei keiner der mit diesen *B. henselae*-Stämmen infizierten Tieren drei Wochen p.i. möglich.

Es gab somit keine Hinweise für eine Genotypabhängigkeit der beobachteten Lymphadenopathie und Erregerkontrolle nach s.c. Infektion von Mäusen mit *B. henselae*.

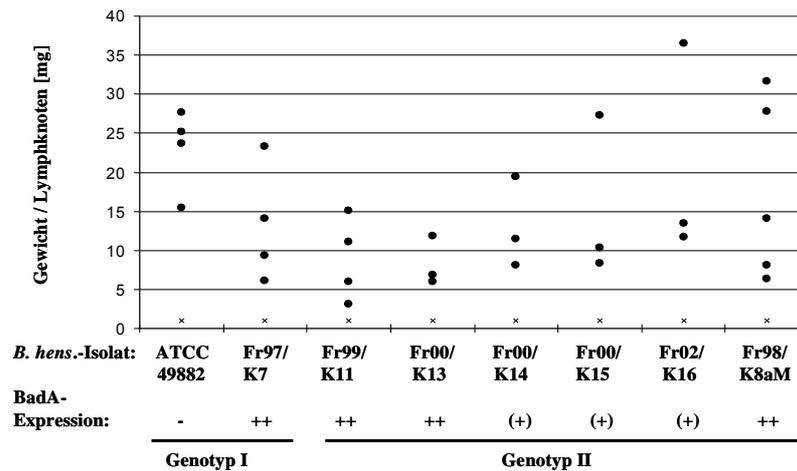


Abbildung 20 Gewicht der drainierenden Lymphknoten nach s.c. Infektion mit verschiedenen *B. henselae*-Isolaten: C57BL/6 Mäuse wurden mit unterschiedlichen Isolaten und Genotypen von *B. henselae* infiziert. Je $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* ATCC 49882 oder Fr97/K7 (Genotyp I) bzw. Fr99/K11, Fr00/K13, Fr00/K14, Fr00/K15, Fr02/K16 oder Fr98/K8aM (Genotyp II) wurden s.c. in den linken Fußrücken der Hintergliedmaßen infiziert. Als Negativkontrolle wurde in den Fußrücken der rechten Hintergliedmaßen s.c. PBS injiziert. Drei Wochen nach Infektion wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen und gewogen. Jeder aufgeführte Wert entspricht einem analysierten Tier. • drainierender Lymphknoten
x Mittelwert der Lymphknotengewichte nach PBS Injektion BadA = Bartonella Adhesin A

4.3 Untersuchung der der Lymphadenopathie von Mäusen nach Infektion mit Bartonellen zugrunde liegenden Vorgänge

Die im Kapitel 4.2. beobachtete Lymphadenopathie des drainierenden Lymphknotens nach s.c. Applikation von *B. henselae* war im Wesentlichen gekennzeichnet durch eine massive Zellzunahme mit einer Verschiebung der relativen Zellanteile zugunsten der B-Zellen bei gleichzeitiger Abwesenheit des Erregers. Als Ursache hierfür kommen eine durch *B. henselae* ausgelöste vermehrte lokale Proliferation von Zellen, ein vermehrtes Einwandern von Zellen und/oder eine Hemmung der Apoptose in Betracht. Voraussetzung dafür ist, dass dieser Erreger vom Immunsystem erkannt wird. Zur Abklärung, welche Mechanismen bei der Lymphadenopathie durch Bartonellen tatsächlich eine Rolle spielen, wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

4.3.1 Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen durch Bartonellen *in vitro*

Zunächst sollte abgeklärt werden, ob dendritische Zellen (DC) und Makrophagen, beide wichtige Vertreter des angeborenen Immunsystems, die aber auch das adaptive Immunsystem entscheidend beeinflussen, auf Bartonellen reagieren. Für humane DC wurde erst kürzlich gezeigt, dass diese *in vitro* nach Infektion mit *B. henselae* ATCC 49882 reifen und zur Zytokinfreisetzung stimuliert werden (248). Zur Untersuchung, ob Bartonellen auch im murinen System die Fähigkeit besitzen, DC zu aktivieren, wurden myeloide dendritische Zellen (mDC) durch Inkubation von murinen Knochenmarkszellen mit GM-CSF generiert und für 24 Stunden mit oder ohne lebende *B. henselae* ATCC 49882, *B. henselae* Fr98/K8aM bzw. *B. grahamii* ATCC 700132 kultiviert. Als Maß für den Reifezustand der Zellen wurde dann die Expression von MHC Klasse II sowie von kostimulatorischen Molekülen (CD40, CD80, CD86) auf der Zelloberfläche untersucht. mDC, die nur eine niedrige Expression dieser Moleküle zeigen, repräsentieren unreife DC mit hoher Endozytosefähigkeit, die nach der Aufnahme von Erregern zu reifen DC mit hoher Expression an kostimulatorischen Molekülen differenzieren und nun effiziente antigenpräsentierende Zellen darstellen (16). In vier unabhängig durchgeführten Experimenten konnte als Indiz für eine Reifung nach Stimulation mit Bartonellen eine Hochregulation der Expression von MHC Klasse II, CD40, CD80 und CD86 beobachtet werden (siehe Abbildung 21).

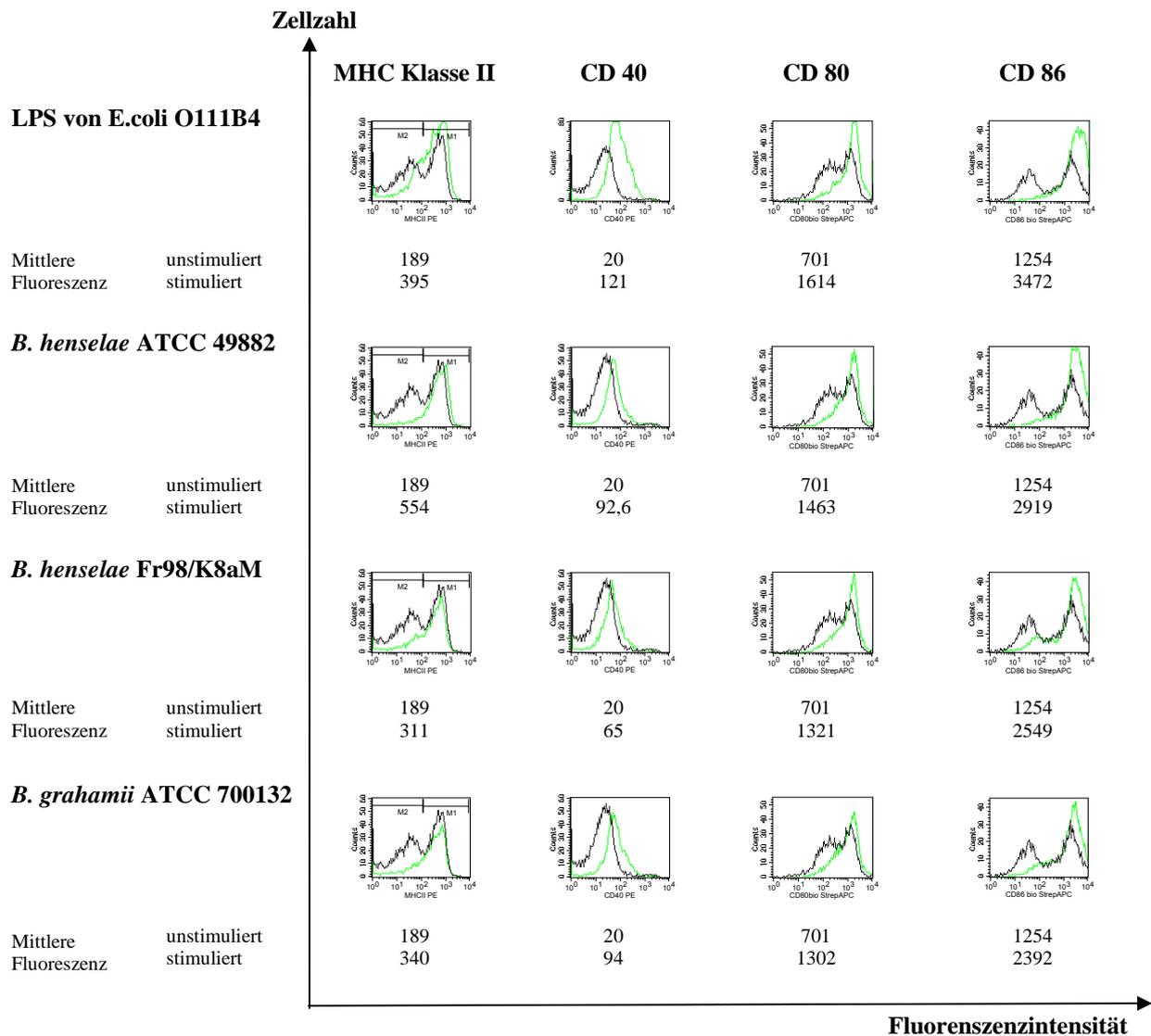


Abbildung 21 Reifung von mDC nach Stimulation mit *B. henselae* und *B. grahamii*: Aus Knochenmarkszellen mit GM-CSF generierte mDC wurden in Medium mit oder ohne lebende *B. henselae* ATCC 49882 (MOI 10) bzw. Fr98/K8aM (MOI 6) oder *B. grahamii* ATCC 700132 (MOI 32) bzw. LPS von *E.coli* O111B4 (1 µg/ml) für 24 h inkubiert und die Expression von MHC Klasse II, CD40, CD80 bzw. CD86 durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden nur lebende, CD11c⁺CD11b⁺ Zellen ausgewertet. Im Histogramm ist die Expression unstimulierter Zellen (schwarze Kurve) gegenüber der stimulierter Zellen (grün) dargestellt. Exemplarisch gezeigt sind die Ergebnisse eines von vier unabhängigen Experimenten.

Als weiteres Anzeichen für die Aktivierung von mDC durch Bartonellen wurde neben der Reifung auch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen gemessen. Parallel hierzu wurde auch die durch Bartonellen induzierte Zytokinproduktion in Makrophagen untersucht, die durch Zugabe von M-CSF aus murinen Knochenmarkszellen in pferdeserumhaltigem Medium generiert wurden (BM-MΦ). Beide Zelltypen wurden jeweils mit lebenden und inaktivierten *B. henselae* ATCC 49882, *B. henselae* Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 in verschiedenen Dosierungen für 48 Stunden inkubiert und schließlich der Gehalt an Nitrit (mittels Griess-Reaktion), TNF, IL-12p40, IL-12p70 (jeweils mittels ELISA) und Typ I Interferonen (mittels VSV-Bioassay) im Überstand bestimmt. Als Kontrollen wurden

unstimulierte Zellen, als Positivkontrollen mit LPS und IFN- γ stimulierte Zellen mitgeführt. Für beide Zelltypen konnte hierbei eine dosisabhängige Freisetzung von Nitrit, TNF, IL-12p40 und Typ I Interferonen in den Überstand nach Stimulation mit lebenden wie inaktivierten *B. henselae* sowie *B. grahamii* gemessen werden. (siehe Abbildungen 22 und 23). IL-12p70 konnte nur in den Positivkontrollen der jeweiligen Versuche detektiert werden. Somit konnte eine durch Bartonellen induzierte Reifung muriner mDC sowie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Nitrit durch murine mDC und BM-M Φ nach Stimulation mit Bartonellen (*B. henselae* wie *B. grahamii*) *in vitro* beobachtet werden.

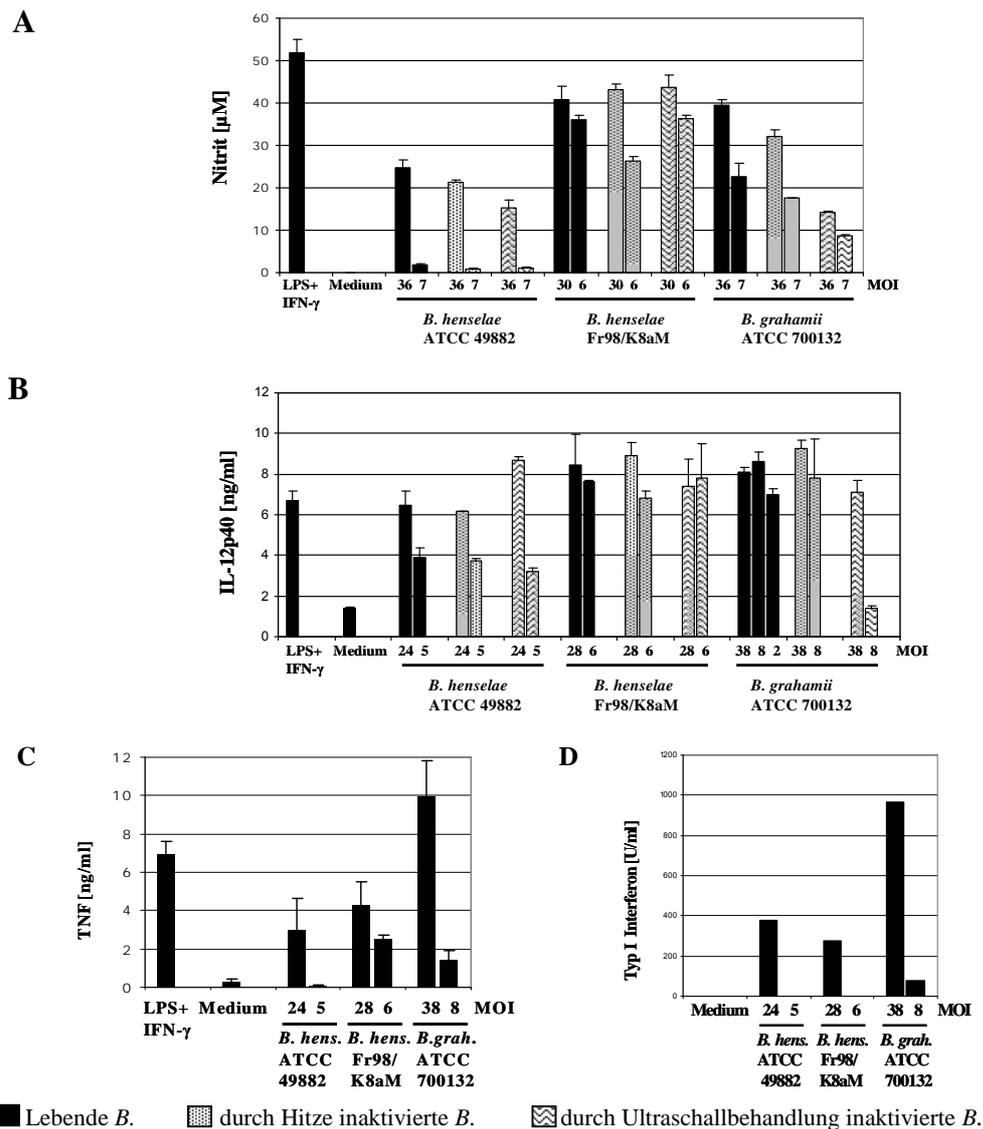


Abbildung 22 Produktion von Nitrit, IL-12p40, TNF und Typ I Interferon durch mDC nach Stimulation mit *B. henselae* und *B. grahamii*: mDC (generiert aus Knochenmarkszellen durch Stimulation mit GM-CSF) wurden in Medium oder zusammen mit *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 kultiviert. Die MOI jedes Versuches wurde durch Kultivierung und Auszählung serieller Verdünnungsreihen ermittelt. Ein Teil der Bakteriensuspension wurde vor der Zugabe zu den Zellen durch Hitze (gekochte *B.*) oder Ultraschall (beschaltete *B.*) inaktiviert. Als Positivkontrolle wurde eine Kombination aus LPS und IFN- γ verwendet (200 ng/ml *E. coli* O111B4 LPS + 20 ng/ml rm IFN- γ). 48 h nach Beginn der Kultivierung wurde der Gehalt an **A.** Nitrit (GRIESS-Reaktion [μ M]), **B.** IL-12p40 (ELISA [ng/ml]), **C.** TNF (ELISA [ng/ml]) und **D.** Typ I Interferon (VSV-Bioassay [U/ml]) in den Überständen bestimmt. Dargestellt sind die gemessenen Werte aus einem repräsentativen von drei durchgeführten Experimenten.

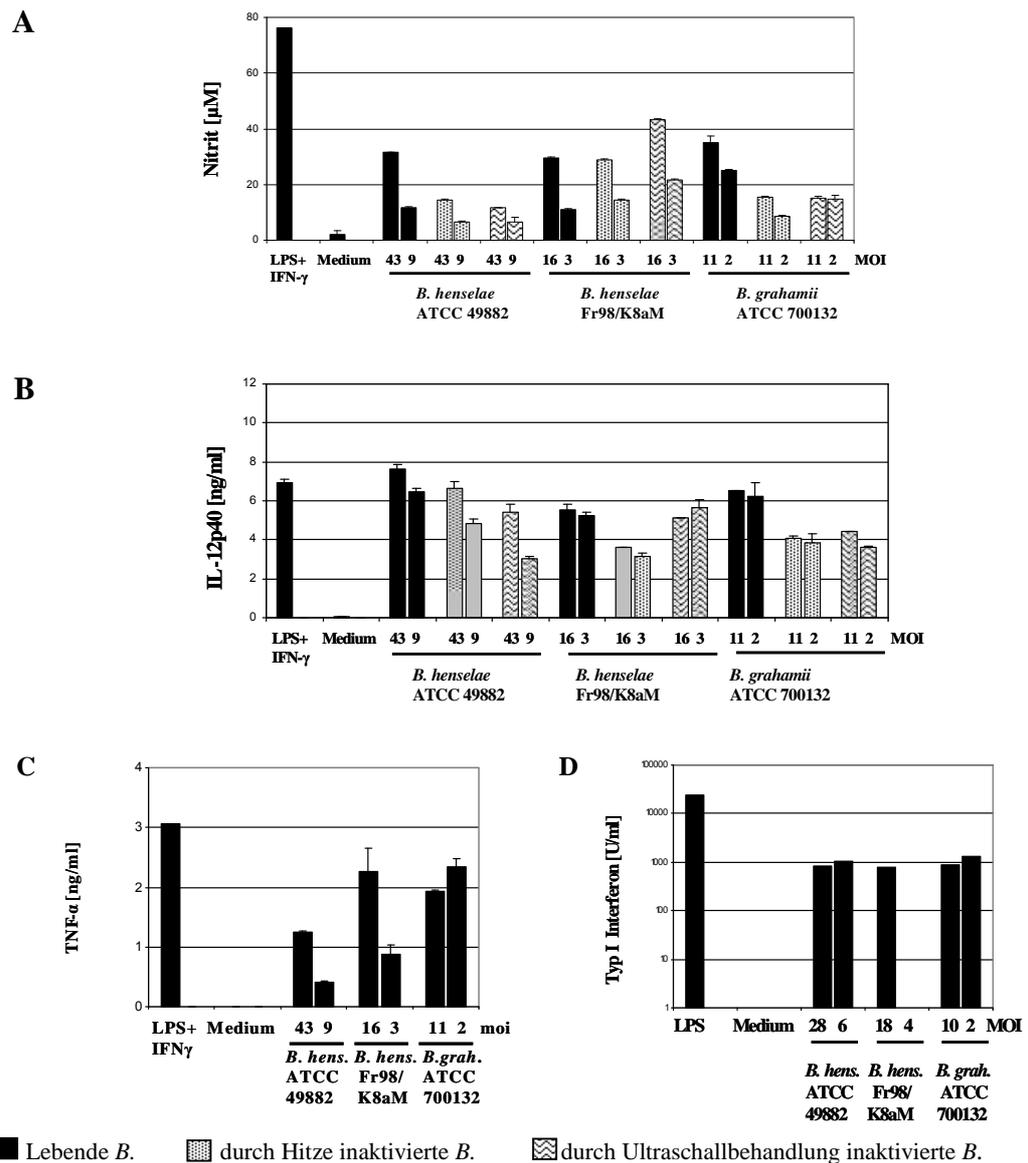


Abbildung 23 Produktion von Nitrit, IL-12p40, TNF und Typ I Interferon durch BM-MΦ nach Stimulation mit *B. henselae* und *B. grahamii*: BM-MΦ (generiert aus Knochenmarkszellen durch Stimulation mit M-CSF) wurden in Medium oder zusammen mit *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 kultiviert. Die MOI jedes Versuches wurde durch Kultivierung und Auszählung serieller Verdünnungsreihen ermittelt. Ein Teil der Bakteriensuspension wurde vor der Zugabe zu Zellen durch Hitze (gekochte *B.*) oder Ultraschall (beschallte *B.*) inaktiviert. Als Positivkontrolle wurde eine Kombination aus LPS und IFN- γ verwendet (200 ng/ml *E.coli* O111B4 LPS + 20 ng/ml rm IFN- γ). 48 h nach Beginn der Kultivierung wurde der Gehalt an **A.** Nitrit (GRIESS-Reaktion [μ M]), **B.** IL12p40 (ELISA [ng/ml]), **C.** TNF- α (ELISA [ng/ml]) und **D.** Typ I Interferon (VSV-Bioassay [U/ml]) in den Überständen bestimmt. Dargestellt sind die gemessenen Werte aus einem repräsentativen von drei durchgeführten Experimenten.

4.3.2 Proliferation und Migration von Zellen nach Infektion mit Bartonellen

Nachdem die Aktivierung von mDC und BM-MΦ durch Bartonellen wie im vorherigen Kapitel beschrieben *in vitro* beobachtet werden konnte, wurde in weiteren Versuchen die Auswirkung einer Infektion mit Bartonellen auf die Proliferation von Immunzellen sowie auf

das Einwandern verschiedener Zellpopulationen in drainierende Lymphknoten *in vivo* untersucht. Zugrundeliegende Fragestellung war die nähere Charakterisierung von Vorgängen, die zur Zunahme der Zellzahl in drainierenden Lymphknoten nach s.c. Infektion mit Bartonellen führen.

4.3.2.1 Proliferation von Zellen nach Infektion mit Bartonellen *in vivo*

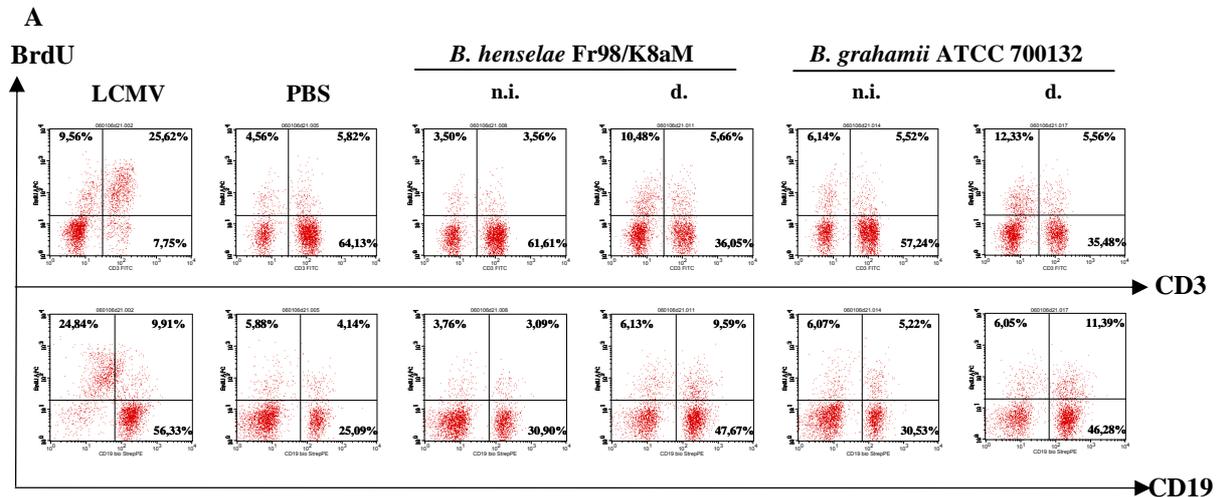
Der Nachweis proliferierender Zellen *in vivo* erfolgte über 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU). Dieses wird während des Zellzyklus als Thymidinanalog in die DNA sich teilender Zellen eingebaut und kann schließlich mittels spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Mit *B. henselae* Fr98/K8aM bzw. *B. grahamii* ATCC 700132 s.c. in eine Hinterpfote infizierten C57BL/6 Mäusen wurde ab Tag 14 bis Versuchsende ausschließlich Trinkwasser mit BrdU angeboten. 21 bis 26 Tage nach Versuchsbeginn wurden die poplitealen Lymphknoten auf ihren Anteil an BrdU⁺ Zellen sowie CD19⁺, CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Als Positivkontrollen dienten die poplitealen Lymphknoten von Lymphozytärem Choriomeningitisvirus (LCMV) infizierten Mäusen, als Negativkontrollen sowohl die poplitealen Lymphknoten der nicht-infizierten Hintergliedmaße infizierter Mäuse als auch die poplitealen Lymphknoten nur mit PBS injizierter Mäuse. Bei dieser Versuchsanordnung konnten im drainierenden Lymphknoten stets zwischen 6 - 12% (*B. henselae* Fr98/K8aM) bzw. 3 - 14% (*B. grahamii*) mehr BrdU positive Zellen nachgewiesen werden als in den Negativkontrollen nach PBS-Injektion (siehe Abbildung 24 A). Die BrdU⁺ Zellen setzten sich in Lymphknoten nach PBS-Injektion in etwa zu gleichen Teilen aus CD3⁺ und CD19⁺ Zellen zusammen. Im drainierenden Lymphknoten bestand die BrdU⁺ Zellpopulation im Mittel aus 33,5% CD3⁺ und 65,5% CD19⁺ Zellen (siehe Abbildung 24 B).

Die Analyse der Gesamtzellkomposition der drainierenden Lymphknoten ergab wie bereits in Kapitel 4.2.1.2 beschrieben eine prozentuale Verschiebung zugunsten der B-Zellen (CD19⁺) bei einer relativen Abnahme der T-Zellen (CD3⁺). Eine Veränderung im Verhältnis der CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen wurde außer nach LCMV-Infektion (welche als Kontrolle diente) nicht beobachtet.

Die Relation der verschiedenen Zellpopulationen war in den Lymphknoten von *B. henselae* Fr98/K8aM- oder *B. grahamii*-infizierten Mäusen unterschiedlos. Wie jedoch bereits in Kapitel 4.2.1.2 beschrieben, führte die s.c. Infektion mit *B. grahamii* zu niedrigeren

Gesamtzellzahlen im drainierenden Lymphknoten im Vergleich zur s.c. Infektion mit *B. henselae* Fr98/K8aM.

Nach s.c. Infektion von Mäusen mit Bartonellen konnte somit im drainierenden Lymphknoten eine Zunahme des Anteils proliferierter Zellen, die zum großen Teil aus B-Zellen bestanden, beobachtet werden.



B

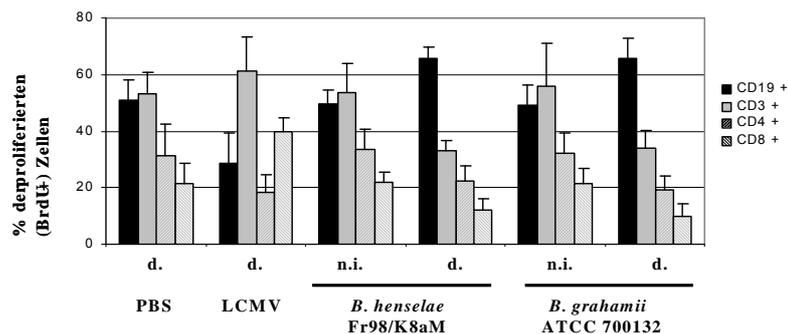


Abbildung 24 Analyse der Zellproliferation *in vivo* in drainierenden Lymphknoten nach s.c. Infektion mit *B. henselae* und *B. grahamii* bzw. LCMV: C57BL/6 Mäuse wurden zu Versuchsbeginn mit je $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 s.c. in den Rücken der linken Hinterpfoten infiziert und ab Tag 14 bis Versuchsende über das Trinkwasser 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU; 0,8 mg/ml) zugeführt. Dieses BrdU wird *in vivo* in die DNA sich teilender Zellen eingebaut und wurde schließlich durchflusszytometrisch in proliferierten Zellen poplitealer Lymphknoten über einen spezifischen APC-konjugierten Antikörper an Tag 21, 24 und 26 nach Versuchsbeginn nachgewiesen. Zusätzlich zu BrdU wurden die Zellen auch für die Oberflächenmarker CD19, CD3, CD4 und CD8 gefärbt. Als Positivkontrolle wurden die poplitealen Lymphknoten von an Tag 15 mit LCMV (200 pfu i.v. + 30 pfu s.c. linke und rechte Hinterpfote) infizierten Mäusen verwendet. Als Negativkontrollen dienten sowohl die poplitealen Lymphknoten der nicht infizierten Hinterpfoten infizierter Tiere (n.i.) als auch popliteale Lymphknoten von Mäusen, denen lediglich PBS injiziert wurde. Die Zufuhr von BrdU war für alle Tiere identisch. Je Zeitpunkt wurden die entsprechenden Lymphknoten von 2 - 3 Mäusen gepoolt. **A.** Repräsentative Ergebnisse der Durchflusszytometrie an Tag 21 nach Versuchsbeginn aus einem von zwei durchgeführten Experimenten. **B.** Prozentualer Anteil der proliferierten (BrdU⁺) CD19-, CD3-, CD4- bzw. CD8-positiven Zellen an den insgesamt (BrdU⁺) proliferierten Zellen als Mittelwert und Standardabweichung d.: drainierender Lymphknoten

4.3.2.2 Einwanderung von Zellen in drainierende Lymphknoten

Neben der lokalen Proliferation von Zellen im drainierenden Lymphknoten nach s.c. Infektion mit Bartonellen wurde als weitere mögliche Ursache der Erhöhung der absoluten Zellzahl sowie des relativen Anteils an B-Zellen im drainierenden Lymphknoten die Einwanderung von Immunzellen untersucht. Hierzu wurden am Tag 10 p.i. CFSE-markierte Milzzellen naiver Mäuse in *B. henselae* Fr98/K8aM- bzw. *B. grahamii* ATCC 700132-infizierte C57BL/6 Mäuse transferiert. 4, 7 und 14 Tage nach Transfer wurden die nach s.c. Infektion drainierenden poplitealen Lymphknoten sowie die nicht-drainierenden brachialen Lymphknoten entnommen und die Zusammensetzung ihrer Zellen anhand der Expression von CD19, CD3, CD4 und CD8 sowie der Fluoreszenz durch CFSE durchflusszytometrisch analysiert. Als zusätzliche Kontrolle wurden CFSE-markierte Zellen auch in PBS-injizierte Mäuse transferiert. In zwei durchgeführten Experimenten konnte so in der CFSE-negativen Zellpopulation im drainierenden Lymphknoten eine relative Zunahme der B-Zellen (CD19⁺) und relative Abnahme der T-Zellen (CD3⁺) bei gleich bleibendem Verhältnis der CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen beobachtet werden (siehe auch Kapitel 4.2.1.2). Die Population der in den drainierenden Lymphknoten eingewanderten CFSE⁺ Zellen setzte sich sowohl bei *B. henselae*- als auch bei *B. grahamii*-infizierten Mäusen (je sieben) aus rund 2/3 B-Zellen (CD19⁺) und 1/3 T-Zellen (CD3⁺) zusammen. In den nicht-drainierenden brachialen Lymphknoten sowie den poplitealen Lymphknoten nach Injektion von PBS bestand die CFSE⁺ Zellpopulation zu rund 1/3 aus B-Zellen und 2/3 aus T-Zellen. Dies galt für 6 von 7 untersuchten Mäusen nach Infektion mit *B. henselae* sowie alle Mäuse nach Infektion mit *B. grahamii*. Bei einer der mit *B. henselae* infizierten Mäusen bestand die CFSE⁺ Zellpopulation auch in den brachialen Lymphknoten überwiegend aus B-Zellen. Ein Unterschied im Verhältnis der CD4⁺ zu CD8⁺ Zellen in der CFSE⁺ Zellpopulation aller untersuchten drainierenden und Kontrolllymphknoten bestand nicht (siehe Abbildung 25). Signifikante Unterschiede im prozentualen Anteil der CFSE⁺ Zellpopulation in den drainierenden poplitealen Lymphknoten im Vergleich zu den brachialen Lymphknoten derselben Maus traten nicht auf.

Nach s.c. Infektion von Mäusen mit Bartonellen konnte somit im drainierenden Lymphknoten sowohl eine Zunahme des Anteils proliferierender Zellen als auch eine gesteigerte Einwanderung von Zellen, die in der Mehrheit aus B-Zellen bestanden, beobachtet werden.

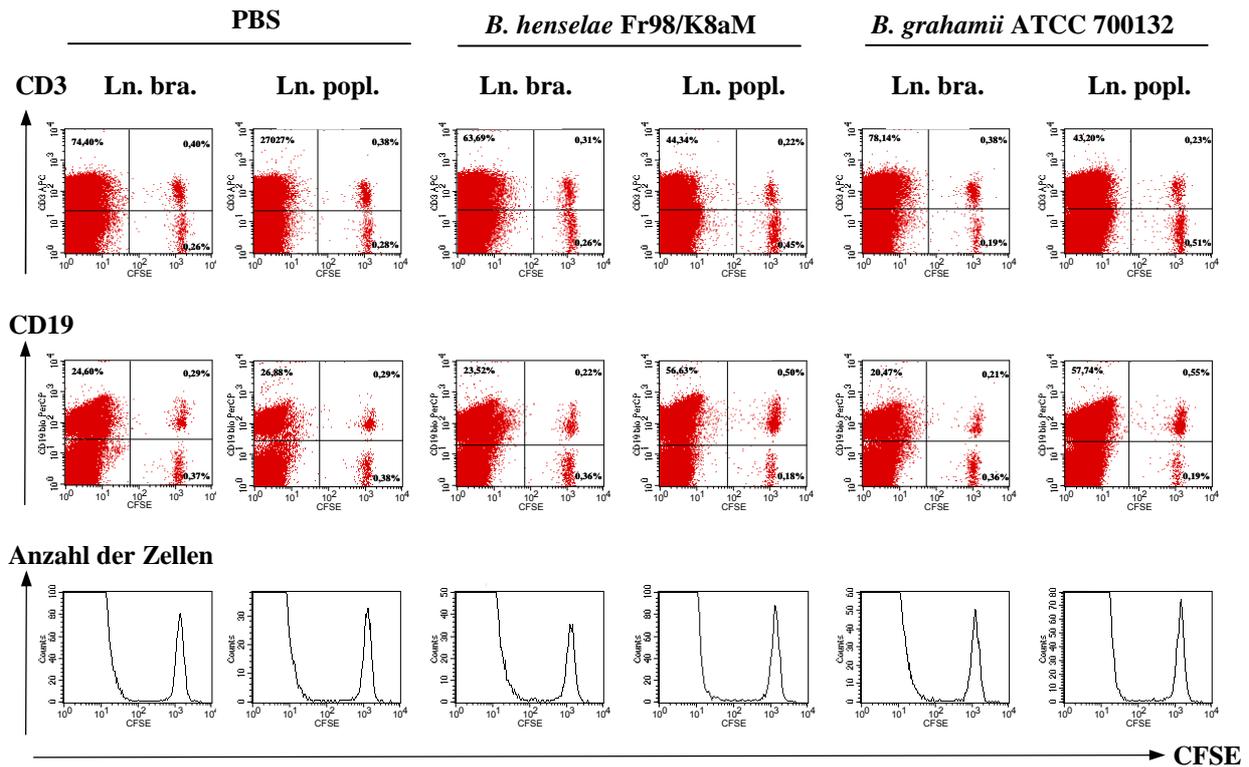


Abbildung 25 Einwanderung von Zellen in den drainierender Lymphknoten nach s.c. Infektion mit *B. henselae* bzw. *B. grahamii*: C57BL/6 Mäuse wurden mit $\sim 10^8$ KBE *B. henselae* Fr98/K8aM bzw. *B. grahamii* s.c. infiziert und ihnen an Tag 10 p.i. 2×10^6 CFSE-markierte Milzzellen naiver C57BL/6 Mäuse transferiert. An Tag 7 p.t. wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten (Ln. popl.) sowie als interne Kontrolle die brachialen Lymphknoten (Ln. bra.) entnommen und eine durchflusszytometrische Analyse der Zellkomposition anhand der Expression von CD3 und CD19 sowie der Fluoreszenz durch CFSE durchgeführt. Als zusätzliche Negativkontrolle wurden parallel mit PBS injizierte Mäuse untersucht. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse eines von zwei durchgeführten Experimenten.

4.3.3 Rolle von Typ I Interferonen bei Infektion mit Bartonellen

Nach s.c. Infektion von Mäusen mit Bartonellen wurde (wie im Kapitel 4.3.2 beschrieben) im drainierenden Lymphknoten sowohl eine vermehrte lokale Proliferation als auch ein vermehrtes Einwandern von Zellen - jeweils bevorzugt von B-Zellen (CD19⁺) - beobachtet. Neben vielen anderen möglichen Regulationsmechanismen hierfür wurde im Folgenden die Rolle von Typ I Interferonen (Interferon- α/β) nach Infektion mit Bartonellen untersucht. Typ I Interferone bilden eine sehr alte und konservierte Klasse von Zytokinen, die zunächst anhand ihrer antiviralen Eigenschaften charakterisiert wurden; heute sind aber auch zahlreiche immunregulatorische Eigenschaften, die die angeborene und erworbene Immunität miteinander verknüpfen sowie eine Beteiligung an der Kontrolle von Tumoren und pathogenen Mikroorganismen bekannt (23, 30). Die Familie der Typ I Interferone setzt sich in der Maus zusammen aus 14 Interferon- α -Subtypen sowie Interferon- β , Interferon- κ , Interferon- ϵ und einer noch unbekannt Anzahl an Limitin-Subtypen (245).

4.3.3.1 Expression von Typ I Interferonen durch pDC *in vitro* nach Stimulation mit lebenden und inaktivierten Bartonellen sowie mit Bartonellen-DNA und -Membranproteinen

Typ I Interferone können grundsätzlich von sehr vielen Zelltypen produziert werden, in sehr großen Mengen werden sie aber von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) v.a. nach viraler Infektion mit sowohl DNA- als auch RNA-Viren freigesetzt (57). Eine Stimulation von pDC mit synthetischen Oligonukleotiden mit unmethylierten CpG-Motiven (CpG) (108, 128, 140) sowie synthetischer GU-reicher Einzelstrang-RNA (ssRNA) (69, 107) als Korrelat bakterieller DNA bzw. RNA führt ebenfalls zur Freisetzung großer Mengen an Typ I Interferonen. In der Maus sind pDC durch folgendes Expressionsmuster myeloider und lymphoider Oberflächenmoleküle charakterisiert: CD11b⁻, CD11c^{int}, B220⁺, Ly6C⁺, GR1⁺, CD62L⁺, CD45RA⁺ (11, 26, 39, 183, 188).

Die in den folgenden Versuchen verwendeten Zellen wurden aus murinem Knochenmark durch Stimulation mit Flt-3 Ligand generiert und anhand der Expression von CD11b⁻ CD11c^{int}CD62L⁺ sortiert. Der Anteil dieser Zellen vor dem Sortieren betrug rund 30 bis 50%. Die Reanalyse nach dem Sortieren ergab eine Reinheit der gesuchten Zellpopulation von über 92%. Als Positivkontrolle für die Freisetzung von Typ I Interferonen wurde das CpG 2216 Oligonukleotid als potentes Stimulans verwendet (140).

Stimulation mit lebenden Bartonellen

pDC wurden ohne und mit *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM und *B. grahamii* ATCC 700132 in verschiedenen Bakterienzahl-zu-Zellzahl-Verhältnissen (*Multiplicity Of Infection*, MOI) für 48 Stunden inkubiert und schließlich der Gehalt an Typ I Interferonen im Überstand im VSV-Bioassay bestimmt. Es wurden dabei nach Stimulation mit Bartonellen dosisabhängig hohe Konzentrationen an Typ I Interferon auf Proteinebene, vergleichbar der Stimulation mit 1 µM CpG 2216, nachgewiesen. Ein Abfall des Typ I Interferon-Gehaltes parallel zu einer abnehmenden Bakterienzahl je Zelle war bei mit *B. henselae* ATCC 49882 stimulierten Zellen bereits bei einer höheren Bakterienzahl zu beobachten als bei mit *B. grahamii* ATCC 700132 stimulierten Zellen. So konnte bei einer MOI zwischen 0,1 und 5 nach Stimulation mit *B. grahamii* stets die höchsten Typ I Interferon-Konzentrationen gemessen werden (siehe Abbildung 26 A). Wurde dagegen mit mehr als rund 10 Bakterien je Zelle stimuliert, nahm der Gehalt an Typ I Interferonen im Überstand wieder ab. Innerhalb eines jeden Versuches konnte auch bei Stimulation mit *B. henselae* FR98/K8aM eine

Dosisabhängigkeit beobachtet werden; Mittelwerte aus mehreren Versuchen zeigten jedoch keine Dosisabhängigkeit für *B. henselae* FR98/K8aM (siehe Abbildung 26 B).

Zum Nachweis der Typ I Interferon Expression auf mRNA-Ebene wurde aus pDC 24 Stunden nach Beginn der Stimulation mit lebenden Bartonellen RNA gewonnen, cDNA synthetisiert und eine quantitative Taqman-PCR für 5 der insgesamt 14 Interferon- α -Subtypen ($-\alpha 4$, $-\alpha 5$, $-\alpha 9$, $-\alpha 11$, $-\alpha 12$) sowie für Interferon- β angeschlossen (245). Auch auf mRNA-Ebene konnte so eine Induktion von Typ I Interferonen beobachtet werden. In allen drei durchgeführten Experimenten wurden unabhängig von der Bartonellen-Spezies Interferon- $\alpha 4$, $-\alpha 5$ und $-\beta$ am stärksten induziert, etwas schwächer exprimiert wurden Interferon- $\alpha 9$ und $-\alpha 12$. Nur schwach oder gar nicht nachweisbar waren Interferon- $\alpha 11$ und $-\alpha 13$ (siehe Abbildung 27).

Die Expression von Typ I Interferon wurde somit sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene nach Stimulation von pDC mit lebenden *B. henselae* und *B. grahamii* gesehen.

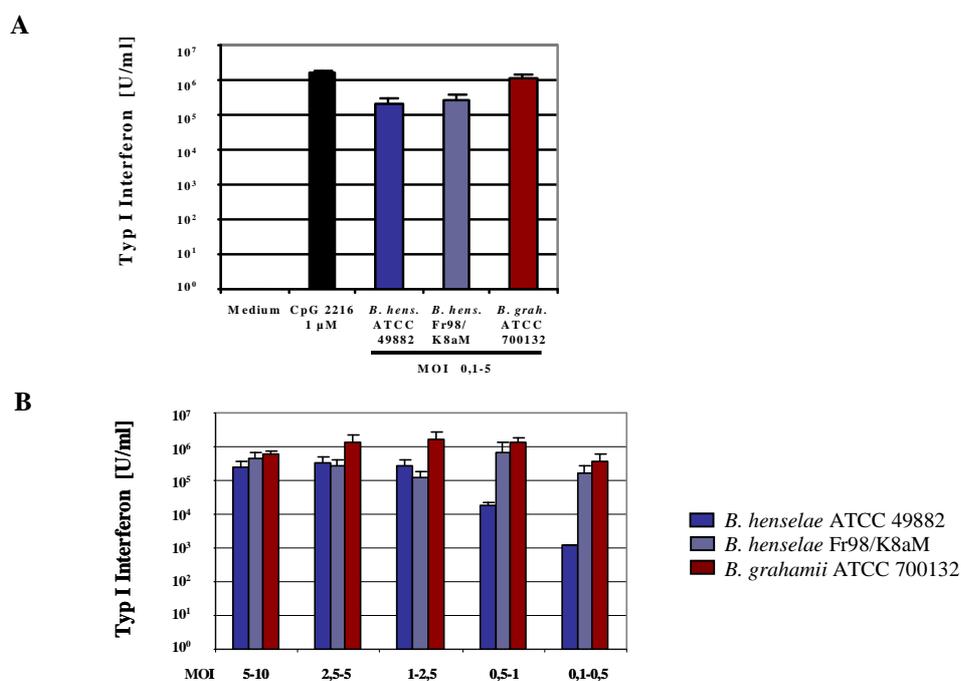


Abbildung 26 Typ I Interferon-Produktion von pDC nach Stimulation mit *B. henselae* und *B. grahamii*: Aus Knochenmarkszellen von C57BL/6 Mäusen mit Flt-3 Ligand generierte und als CD11b⁺CD11c^{int}CD62L⁺ sortierte pDC wurden in Medium oder in Anwesenheit von lebenden *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 kultiviert. Die MOI jedes Versuches wurde durch Kultivierung und Auszählung serieller Verdünnungsreihen ermittelt. Als Positivkontrolle wurde CpG 2216 (1 μ M) verwendet. 48 h p.s. wurde der Gehalt an Typ I Interferonen in den Zellüberständen mittels VSV-Bioassay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus 10 unabhängigen Experimenten. **A.** Vergleich der Typ I Interferon-Produktion nach Stimulation mit *B. henselae* und *B. grahamii* bei identischer MOI **B.** Typ I Interferon-Produktion nach Stimulation mit unterschiedlichen MOI

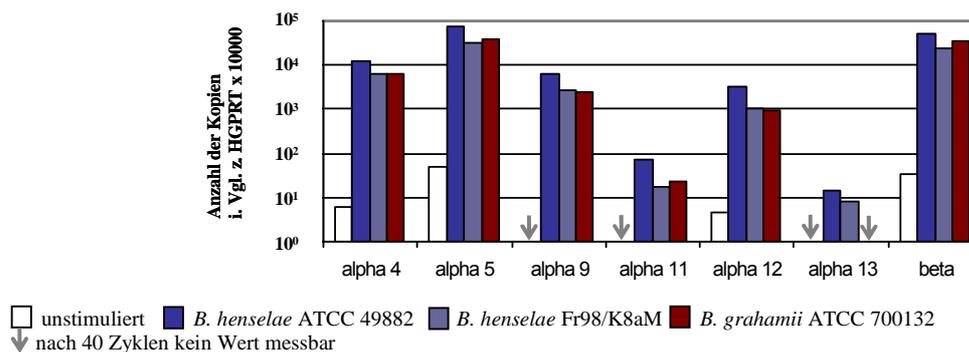


Abbildung 27 Typ I Interferon-mRNA-Expression von pDC nach Stimulation mit *B. henselae* und *B. grahamii*: Aus Knochenmarkszellen von C57BL/6 Mäusen mit Flt-3 Ligand generierte und als CD11b⁻CD11c^{int}CD62L⁺ sortierte pDC wurden in Medium oder in Anwesenheit von lebenden *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 kultiviert (MOI 0,5 - 3). 24 h nach Stimulation wurden die Zellen geerntet, die RNA aufgearbeitet, cDNA synthetisiert und eine quantitative Taqman-PCR angeschlossen. Hierbei wurde die Anzahl der jeweiligen Interferon - α 4, - α 5, - α 9, - α 11, - α 12, - α 13 bzw. - β - Genkopien im Vergleich zur Anzahl der Kopien des HGPRT-Gens als Referenzgen gemessen. Proben, die auch nach 40 PCR-Zyklen kein positives Signal aufwiesen, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Obige Abbildung repräsentiert die Ergebnisse eines von drei unabhängigen Experimenten.

Stimulation mit inaktivierten Bartonellen

Analog zur Stimulation mit lebenden Bartonellen wurden pDC auch mit durch Hitze und Ultraschallbehandlung inaktivierten *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM und *B. grahamii* ATCC 700132 für 48 Stunden inkubiert und die Freisetzung von Typ I Interferonen in den Überstand mittels VSV-Bioassay gemessen. Auch nach Stimulation mit inaktivierten Bartonellen war der Nachweis von Typ I Interferonen im VSV-Bioassay aus Zellüberständen von pDC möglich. Die gemessenen Konzentrationen waren jedoch stets niedriger als nach paralleler Stimulation mit lebenden Bartonellen. So führte eine Inaktivierung durch Erhitzen zu einer Reduktion von im Mittel einer Ig-Stufe, eine Inaktivierung durch Ultraschallbehandlung um eine (*B. henselae* Fr98/K8aM), zwei (*B. henselae* ATCC 49882) bzw. vier (*B. grahamii*) Ig-Stufen (siehe Abbildung 28).

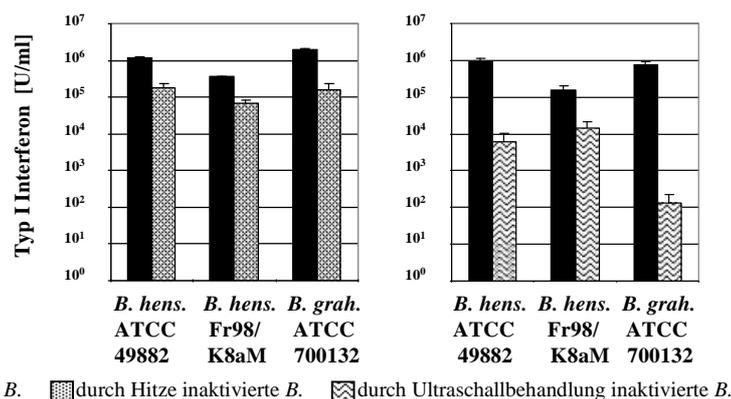


Abbildung 28 Typ I Interferon-Produktion von pDC nach Stimulation mit inaktivierten *B. henselae* und *B. grahamii* : Aus Knochenmarkszellen von C57BL/6 Mäusen mit Flt-3 Ligand generierte und als CD11b⁻CD11c^{int}CD62L⁺ sortierte pDC wurden in Anwesenheit von lebenden oder inaktivierten *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 kultiviert. Die zur Stimulation verwendeten Bakterien wurden nach dem Einrühren in Medium entweder direkt eingesetzt (lebende *B.*) oder zunächst durch Hitze (Hitzeinaktivierte *B.*) oder Ultraschallbehandlung (Ultraschallbehandelte *B.*) inaktiviert. 48 h p.s. wurde der Gehalt an Typ I Interferonen in den Zellüberständen mittels VSV-Bioassay bestimmt. Verglichen wurden jeweils Ansatzpaare nach Stimulation mit gleicher Bakteriensuspension vor und nach deren Inaktivierung. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler aus mind. sechs unabhängigen Experimenten mit in mehreren Konzentrationen eingesetzten Bakteriensuspensionen.

Stimulation mit Bartonellen-DNA und -Membranproteinen

Da bakterielle DNA bereits als ein Induktor der Typ I Interferon-Freisetzung durch pDC bekannt ist (s.o.), wurde auch DNA aus Bartonellen auf diese Eigenschaft hin überprüft. Hierzu wurde aus *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM und *B. grahamii* ATCC 700132 genomische DNA extrahiert und pDC für 48 Stunden mit dieser in Konzentrationen von 1 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,01 µg/ml inkubiert. Nach Stimulation mit 1 µg/ml genomischer DNA konnte so in vier durchgeführten Experimenten eine Freisetzung von Typ I Interferon in den Überstand im VSV-Bioassay gemessen werden (siehe Abbildung 29).

Die Möglichkeit der Induktion von Typ I Interferon durch Membranproteine von Bartonellen wurde ebenfalls überprüft. Hierzu wurde aus *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM und *B. grahamii* ATCC 700132 mittels Ultrazentrifugation die Gesamtmembran aufgereinigt und durch Sarkosylzugabe die äußeren (OMP) und inneren (IMP) Membranproteine separiert. pDC wurden für 48 Stunden mit 1 µg/ml und 0,1 µg/ml OMP bzw. IMP inkubiert und im Überstand der Gehalt an Typ I Interferonen mittels VSV-Bioassay bestimmt. Die nach Stimulation mit OMP von Bartonellen im VSV-Bioassay gemessenen Typ I Interferon-Werte schwankten zwischen „nicht nachweisbar“ und 1170 U/ml. Die in vier durchgeführten Experimenten erhaltenen Werte ließen sich nicht zu einem einheitlichen Ergebnis zusammenfassen (siehe Tabelle 34). Nach Stimulation von pDC mit IMP von Bartonellen konnte mit keiner der eingesetzten Konzentrationen in vier Experimenten eine Freisetzung von Typ I Interferonen in den Überstand beobachtet werden. Die Morphologie von pDC und

anderen Zellen nach Inkubation mit und ohne IMP wies lichtmikroskopisch keine Unterschiede auf und deutete somit nicht auf einen toxischen Effekt der IMP hin.

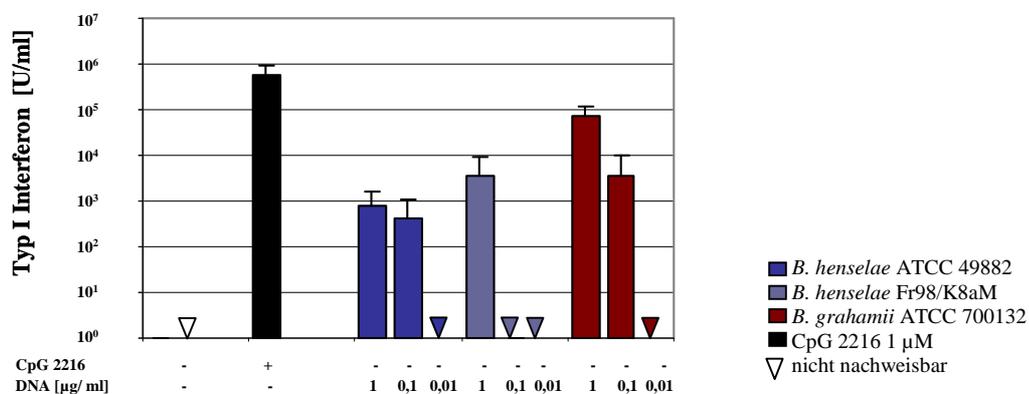


Abbildung 29 Typ I Interferon-Produktion von pDC nach Stimulation mit Bartonella-DNA: Aus Knochenmarkszellen von C57BL/6 Mäusen mit Flt-3 Ligand generierte und als CD11b⁻CD11c^{int}CD62L⁺ sortierte pDC wurden in Medium oder in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen genomischer DNA aus *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM oder aus *B. grahamii* ATCC 700132 kultiviert (Endkonzentrationen 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml). 48 h p.s. wurde der Gehalt an Typ I Interferonen in den Zellüberständen mittels VSV-Bioassay bestimmt. Als Positivkontrolle wurde CpG 2216 (1 µM) verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten.

		1 ng OMP/µl	0,1 ng OMP/µl
OMP von <i>B. henselae</i> ATCC 49882	Exp. 1	n.n.	595
	Exp. 2	205	5,5
	Exp. 3	n.n.	n.n.
	Exp. 4	n.n.	n.n.
OMP von <i>B. henselae</i> Fr98/K8aM	Exp. 1	400	n.n.
	Exp. 2	384	365
	Exp. 3	1170	83
	Exp. 4	42	n.n.
OMP von <i>B. grahamii</i> ATCC 700132	Exp. 1	n.n.	305
	Exp. 2	n.n.	198
	Exp. 3	215	n.n.
	Exp. 4	n.n.	111

Tabelle 34 : Typ I Interferon-Produktion von pDC nach Stimulation mit OMP von Bartonellen Aus Knochenmarkszellen von C57BL/6 Mäusen mit Flt-3 Ligand generierte und als CD11b⁻CD11c^{int}CD62L⁺ sortierte pDC wurden in Medium oder in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen äußerer Membranproteine von *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 kultiviert (Endkonzentrationen 1 ng/µl, 0,1 ng/µl). 48 h p.s. wurde der Gehalt an Typ I Interferon in den Zellüberständen mittels VSV-Bioassay bestimmt. In der Tabelle aufgeführt sind die in vier Experimenten (Exp.) ermittelten Konzentrationen an Typ I Interferon [U/ml] nach Stimulation mit OMP. In jedem Experiment wurden als Positivkontrolle mit CpG 2216 stimulierte Zellen mitgeführt, die jeweils über 10⁵ U/ml Typ I Interferon freisetzen. n.n.: Wert unterhalb der Nachweisgrenze

4.3.3.2 Expression von Typ I Interferonen in MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-}, TLR9^{-/-} und TLR4^{-/-} plasmazytoiden dendritischen Zellen nach Stimulation mit Bartonellen *in vitro*

Die Aktivierung von pDC zur Freisetzung von Typ I Interferonen durch lebende oder inaktivierte Bartonellen sowie durch Bartonellen-DNA warf die Frage nach dem hierfür verantwortlichen Rezeptor auf. Mikrobielle Antigene werden häufig durch sog. *Pattern Recognition Receptors* der *Toll-like* Rezeptor (TLR) Superfamilie erkannt (119). Murine pDC exprimieren vornehmlich die in Endosomen vorliegenden TLR9 und TLR7, wohingegen TLR3 nicht exprimiert wird (119, 252). Die Signalwege von TLR9 und TLR7 führen über das Adaptormolekül *Myeloid Differentiation Factor-88* (MyD88) zur Aktivierung von *Nuclear Factor* (NF)- κ B (4) oder *Interferon Regulatory Factor* (IRF)-7, welche wiederum eine rasche Typ I Interferon-Freisetzung auslösen. Eine MyD88-unabhängige Signaltransduktion und Freisetzung von Interferon- α/β nach Aktivierung von TLR3 und TLR4 ist über den *TIR Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- β* (TRIF) möglich (265). Im Folgenden wurde die Abhängigkeit der durch Bartonellen induzierten Freisetzung von Typ I Interferon durch pDC von diesen beiden bekannten Signalwegen überprüft.

Stimulation von MyD88^{-/-} bzw. TRIF^{-/-} pDC

Aus Knochenmark angezüchtete pDC von Wildtyp, MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäusen wurden für 48 h mit lebenden *B. henselae* ATCC 49882 bzw. FR98/K8aM und *B. grahamii* ATCC 700132 inkubiert. In zwei durchgeführten Experimenten konnte im Kulturüberstand von MyD88^{-/-} pDC kein Typ I Interferon mittels VSV-Bioassay nachgewiesen werden (siehe Abbildung 30). Nach Stimulation von TRIF^{-/-} pDC mit lebenden Bartonellen zeigte sich in einem durchgeführten Experiment kein signifikanter Unterschied im Typ I Interferon-Gehalt der Überstände von TRIF^{-/-} und parallel dazu angesetzten TRIF^{+/+} pDC (siehe Abbildung 30).

Die Induktion von Typ I Interferon nach Stimulation von pDC mit lebenden Bartonellen zeigte somit eine Abhängigkeit von MyD88, nicht jedoch von TRIF.

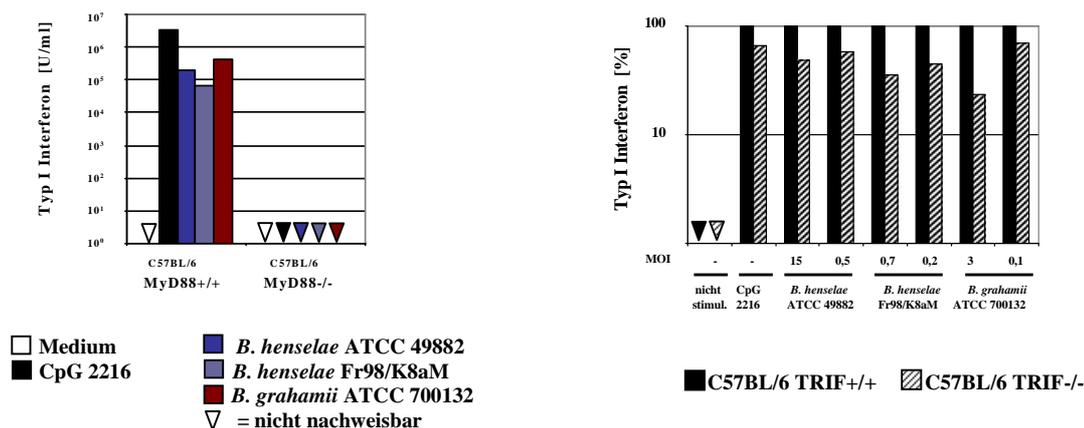


Abbildung 30 Typ I Interferon-Produktion von MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} pDC nach Stimulation mit *B. henselae* und *B. grahamii*: Knochenmarkszellen von C57BL/6 MyD88^{-/-} bzw. TRIF^{-/-} Mäusen sowie entsprechenden Kontrolltieren wurden mit Flt-3 Ligand für eine Woche kultiviert und anschließend die Population der CD11b⁺CD11c^{int}CD62L⁺ pDC sortiert. Diese Zellen wurden in Medium oder in Anwesenheit von lebenden *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 kultiviert und 48 h p.s. der Gehalt an Typ I Interferonen in den Zellüberständen mittels VSV-Bioassay bestimmt. Als Positivkontrolle wurde CpG 2216 (1 μ M) verwendet. Abgebildet sind die repräsentativen Ergebnisse eines von zwei (MyD88^{-/-}) bzw. eines Experimentes (TRIF^{-/-}).

Stimulation von TLR9^{-/-} pDC sowie Präinkubation mit Chloroquin

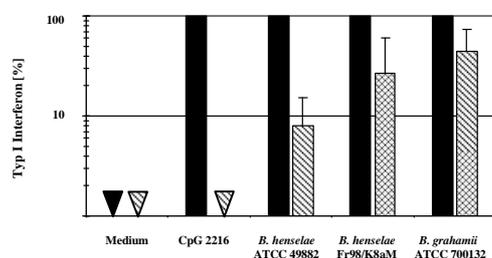
Die von pDC hauptsächlich exprimierten, MyD88-abhängigen TLRs (TLR9 und TLR7) liegen intrazellulär im endosomalen Kompartiment vor (252). Eine Stimulation über diese Rezeptoren ist abhängig von der Ansäuerung des endosomalen Kompartiments und kann durch Chloroquin, welches dort eine Absenkung des pH-Wertes verhindert, inhibiert werden (154, 158). Bekannte Liganden von TLR7 und TLR9 sind Einzelstrang-RNA bzw. unmethylierte DNA und das Malariapigment Hemozoin (53, 119). Zur Abklärung der Bedeutung dieser beiden Rezeptoren für die Bartonellen-bedingte Induktion von Typ I Interferon wurden die Freisetzung von Typ I Interferon durch TLR9^{-/-} pDC sowie durch Chloroquin-behandelte pDC nach Stimulation mit Bartonellen gemessen.

pDC aus TLR9^{-/-} Mäusen setzten in allen durchgeführten Experimenten Typ I Interferon nach Inkubation mit *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM und *B. grahamii* ATCC 700132, nicht jedoch nach Inkubation mit CpG 2216, in den Überstand frei. Die gemessenen Konzentrationen lagen jedoch stets unter denen der vergleichbaren Ansätze mit TLR9^{+/+} pDC (siehe Abbildung 31 A).

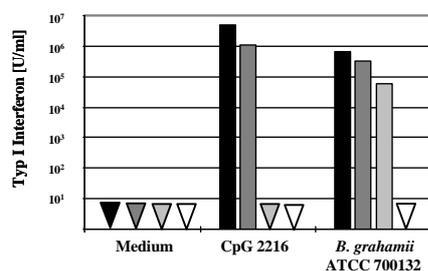
In weiteren Versuchen wurden aus Wildtyp- bzw. TLR9^{-/-} Mäusen generierte pDC vor Zugabe von *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM und *B. grahamii* ATCC 700132 für zwei Stunden mit Chloroquin in unterschiedlicher Konzentration präinkubiert und 48 Stunden p.s. der Gehalt an Typ I Interferon im Überstand mittels VSV-Bioassay gemessen. Nach Präinkubation mit 0,01 mM Chloroquin konnte in keinem von vier Experimenten mit Wildtyp-pDC sowie in keinem von zwei durchgeführten Experimenten mit pDC aus TLR9^{-/-}

Mäusen unabhängig von der verwendeten Bartonellen-Spezies im Überstand Typ I Interferon nachgewiesen werden. (siehe Abbildung B für die Stimulation mit *B. grahamii*). Da Chloroquin abhängig von der Konzentration einen zytotoxischen Effekt aufweist und ein Absterben der Zellen somit die Ursache für die nicht nachzuweisende Typ I Interferon-Freisetzung nach Präinkubation mit Chloroquin sein könnte, wurde beim Abnehmen der Überstände das Vorhandensein lebender Zellen unter den aktuellen Versuchsbedingungen durch Propidiumjodidfärbung durchflusszytometrisch kontrolliert. Auch bei einer Konzentration von 0,01 mM Chloroquin wurden nach Stimulation mit Bartonellen noch eine zur Freisetzung messbarer Typ I Interferon-Mengen ausreichende Anzahl lebender Zellen gefunden.

A

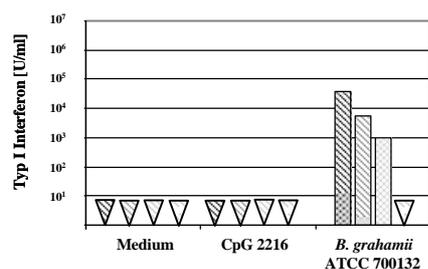


B



■ C57BL/6 TLR9 +/+ 0 mM Chloroquin
 ■ C57BL/6 TLR9 +/+ 0,001 mM Chloroquin
 ■ C57BL/6 TLR9 +/+ 0,005 mM Chloroquin
 □ C57BL/6 TLR9 +/+ 0,01 mM Chloroquin
 ▨ C57BL/6 TLR9 -/- 0 mM Chloroquin
 ▨ C57BL/6 TLR9 -/- 0,001 mM Chloroquin
 ▨ C57BL/6 TLR9 -/- 0,005 mM Chloroquin
 □ C57BL/6 TLR9 -/- 0,01 mM Chloroquin

C



▽ = nicht nachweisbar

Abbildung 31 Typ I Interferon-Produktion von TLR9^{-/-}pDCs bei Kultivierung ohne bzw. mit Chloroquin: Mit Flt-3 Ligand aus Knochenmarkszellen von C57BL/6 Wildtypmäusen bzw. TLR9^{-/-} Mäusen (C57BL/6 Hintergrund) generierte und als CD11b⁺CD11c^{int}CD62L⁺ Zellpopulation sortierte pDCs wurden nach Präinkubation (2h) bei unterschiedlichen Chloroquin-Konzentrationen entweder in Medium oder in Anwesenheit von lebenden *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 kultiviert. Als Positivkontrolle wurde CpG 2216 (1 μ M) verwendet. 48h p.s. wurde der Gehalt an Typ I Interferonen in den Zellüberständen mittels VSV-Bioassay bestimmt. **A.** Typ I Interferon-Produktion von TLR9^{-/-} Mäusen und Kontrollmäusen (100%) nach Stimulation mit lebenden *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM und *B. grahamii* ATCC 700132 ohne Chloroquin; abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mind. 7 Ansätzen aus mind. 4 Experimenten (moi 0,1- 10) **B.** nach Präinkubation mit Chloroquin (0,001-0,01mM) gemessene Typ I Interferon-Produktion von Wildtyp-pDCs bzw. **C.** TLR9^{-/-} pDCs; abgebildet sind repräsentative Ergebnisse nach Stimulation mit *B. grahamii* aus einem von vier (Wildtyp-pDCs) bzw. zwei (TLR9^{-/-} pDCs) unabhängig durchgeführten Experimenten.

Stimulation von TLR4^{-/-} pDC

Eine Freisetzung von Typ I Interferon durch pDC ist bekannt nach Stimulation mit Liganden für TLR9 und TLR7, nicht jedoch für den TLR4-Liganden LPS (56). Kürzlich wurde allerdings eine anhand der Hochregulation von CD40 und CD86 gemessene Aktivierung muriner pDC auch nach Stimulation mit LPS *in vivo* und *in vitro* beschrieben (12). Da Bartonellen als Gram-negative Bakterien LPS in großer Menge aufweisen, wurde auch die Abhängigkeit der Typ I Interferon-Induktion von TLR4 nach Stimulation von pDC mit lebenden Bartonellen überprüft. Hierzu wurden pDC aus murinem Knochenmark von TLR4^{-/-} Mäusen (C57BL/10 ScN) mit *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM und *B. grahamii* ATCC 700132 für 48 h stimuliert und anschließend der Gehalt an Typ I Interferon im Überstand mittels VSV-Bioassay gemessen. Als Kontrolle wurden parallel dazu gewonnene pDC aus C57BL/10-Wildtyp-Mäusen verwendet.

In zwei durchgeführten Experimenten konnte kein signifikanter Unterschied der Typ I Interferon Konzentration in den Überständen von TLR4^{-/-} pDC und parallel durchgeführten Ansätzen mit TLR4^{+/+} pDC festgestellt werden (siehe Abbildung 32).

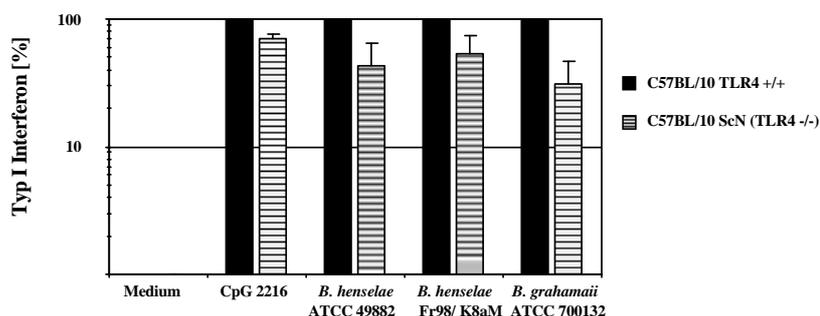


Abbildung 32 Typ I Interferon- Produktion von TLR4^{-/-} pDC nach Stimulation mit *B. henselae* und *B. grahamii*: Knochenmarkszellen von TLR4^{-/-} Mäusen (C57BL/10ScN) sowie entsprechenden Kontrolltieren wurden mit Flt-3 Ligand für eine Woche kultiviert und anschließend die Population der CD11b⁻ CD11c^{int}CD62L⁺ pDC sortiert. Diese Zellen wurden in Medium oder in Anwesenheit von lebenden *B. henselae* ATCC 49882 bzw. Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 kultiviert. Als Positivkontrolle wurde CpG 2216 (1 μ M) verwendet. 48 h p.s. wurde der Gehalt an Typ I Interferonen in den Zellüberständen mittels VSV-Bioassay bestimmt und zwischen TLR4^{+/+} Zellen (Werte wurden auf 100% gesetzt) und TLR4^{-/-} Zellen verglichen. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Experimenten.

Somit ist die Bartonellen-bedingte Freisetzung von Typ I Interferon durch pDC *in vitro* vollständig von MyD88 und teilweise von TLR9 abhängig und durch Chloroquin komplett inhibierbar.

4.3.3.3 Einfluß von Typ I Interferonen *in vivo*

Für Typ I Interferone sind u.a. zahlreiche immunregulatorische Effekte bekannt (30), die möglicherweise zur Entstehung der Lymphadenopathie nach Bartonelleninfektion und der dabei beobachteten Zellproliferation und B-Zelleinwanderung beitragen. Nachdem *in vitro* die Freisetzung großer Mengen an Typ I Interferon durch pDC nach Stimulation mit Bartonellen beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage nach der Bedeutung von Typ I Interferonen für die Pathogenese der s.c. Infektion von Mäusen mit *B. henselae* bzw. *B. grahamii in vivo*. Deshalb wurden Wildtypmäuse und Mäuse, denen der Interferon- α/β -Rezeptor (IFNAR) und damit die Fähigkeit zur Reaktion auf Typ I Interferon fehlt, mit *B. henselae* Fr98/K8aM bzw. *B. grahamii* in jeweils zwei Experimenten s.c. infiziert. Drei bis vier Wochen nach Infektion wurde Gewicht und Zusammensetzung der drainierenden Lymphknoten analysiert und aus verschiedenen Organen Kulturen angelegt.

Diese Tiere zeigten im untersuchten Zeitraum keine Störung des Allgemeinbefindens oder sonstige krankhaften Veränderungen abgesehen einer vorübergehenden Entzündung an der Injektionsstelle (siehe auch Kapitel 4.2.1.1.).

Sowohl mit *B. henselae* Fr98/K8aM infizierte IFNAR-defiziente Mäuse als auch die parallel infizierten Wildtyp-Tiere wiesen drei Wochen nach Infektion drainierende Lymphknoten mit deutlich erhöhtem Gewicht auf (siehe Abbildung 33).

Nach Infektion mit *B. grahamii* ATCC 700132 konnte drei Wochen p.i. lediglich bei IFNAR-defizienten Mäusen ein deutlich erhöhtes Gewicht des drainierenden Lymphknotens festgestellt werden. Die gleichzeitig infizierten Wildtyp-Mäuse entwickelten wie auch bereits in Kapitel 4.2.1.2. beschrieben nur leicht vergrößerte Lymphknoten (siehe Abbildung 33).

Bei keinem der infizierten Tiere gelang 3 Wochen p.i. eine Anzucht des Erregers aus Haut (Inokulationsstelle), Milz, Leber, Blut, oder Knochenmark.

Eine durchflusszytometrische Untersuchung der Zellzusammensetzung von insgesamt fünf drainierenden Lymphknoten aus zwei Versuchen drei Wochen nach s.c. Infektion (*B. henselae* Fr98/K8aM) von IFNAR-defizienten Mäusen ergab jeweils eine relative Verschiebung zugunsten der CD19⁺ Zellen bei einer relativen Abnahme der CD3⁺ Zellen (im Mittel 50,95% CD19⁺ Zellen bei 39,26 % CD3⁺ Zellen).

Somit führte das Fehlen des IFNAR bei *B. grahamii*-infizierten Mäusen zu einer deutlich ausgeprägteren Lymphadenopathie, während der Verlauf einer *B. henselae*-Infektion bei Wildtyp- und IFNAR-defizienten Mäusen vergleichbar war.

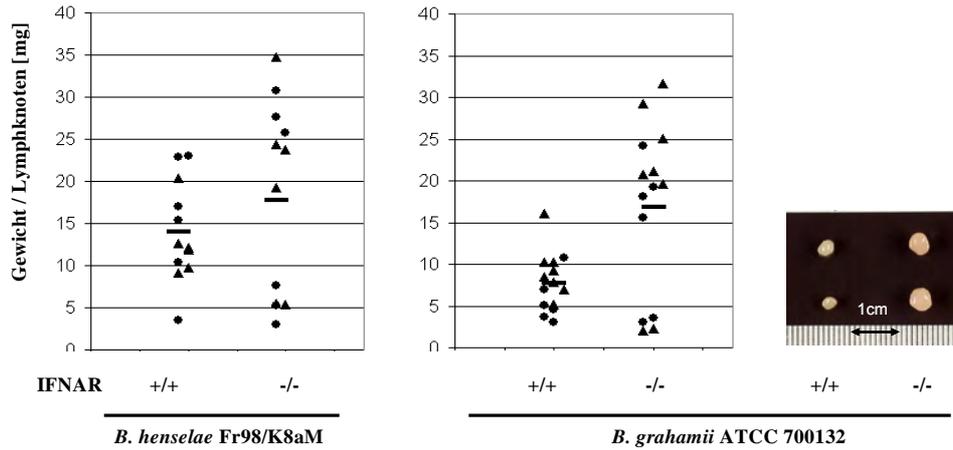


Abbildung 33 Gewicht der drainierenden Lymphknoten nach s.c. Infektion Interferon- α/β -Rezeptor (IFNAR)-defizienter Mäusen mit *B. henselae* bzw. *B. grahamii*: IFNAR-defiziente Mäuse (C57BL/6 Hintergrund) sowie entsprechende Wildtypkontrolltiere wurden mit je $\sim 10^8$ KBE von entweder *B. henselae* Fr98/K8aM oder *B. grahamii* ATCC 700132 s.c. infiziert. 21 bis 24 Tage nach Infektion wurden die drainierenden poplitealen Lymphknoten entnommen und ihr Gewicht [mg] bestimmt. Dargestellt sind die Werte aus je zwei unabhängigen Experimenten. Auf der Photographie sind beispielhaft nach s.c. Infektion von Wildtyp- bzw. IFNAR-defizienten Tieren mit *B. grahamii* ATCC 700132 je zwei der drainierenden poplitealen Lymphknoten an Tag 21 p.i. zu sehen. • Experiment 1 ▲ Experiment 2 — Mittelwert

5 Diskussion

Die Mehrzahl der Infektionen immunkompetenter Menschen mit *B. henselae* verläuft gutartig (43). Dennoch verdient die KKK eine besondere Aufmerksamkeit, da sie häufig auftritt, von anderen infektiösen oder auch malignen Prozessen abgegrenzt werden muß, und möglicherweise eine immunpathogenetische Ursache hat (206). Das bisherige Wissen hierüber ist aufgrund der begrenzten Untersuchungsmöglichkeiten am Patienten oder an entnommenen Lymphknoten gering. Mehr Möglichkeiten zur Analyse böte ein Tiermodell einer durch *B. henselae* hervorgerufenen Lymphadenopathie. Bereits publizierte Mausmodelle beschreiben den Verlauf einer Infektion mit *B. henselae* nach intraperitonealer oder intravenöser Infektion, nicht jedoch eine Lymphadenopathie. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Etablierung eines Tiermodells der subkutane Infektionsweg gewählt, um die Beteiligung eines drainierenden Lymphknotens zu gewährleisten. Als Modellorganismus wurde die Maus ausgesucht, da sie wie der immunkompetente Mensch ebenfalls kein Reservoirwirt für *B. henselae* zu sein scheint (201). Zum Vergleich wurden Mäuse mit *B. grahamii*, einer aus Nagetieren isolierten, wenig wirtsspezifischen *Bartonella* Spezies, sowie mit *B. quintana*, die mit *B. henselae* sehr eng verwandt ist (6), infiziert. Alle Mäuse konnten die Infektion ohne Entwicklung äußerlich erkennbarer Krankheitssymptome innerhalb weniger Tage kontrollieren und die Erreger eliminieren. Die nähere Begutachtung der drainierenden Lymphknoten zeigte, dass nur die mit *B. henselae* infizierten Mäuse eine auffällige Lymphadenopathie entwickelten, während die mit einer der beiden anderen *Bartonella*-Spezies infizierten Tiere nur eine milde Lymphknotenvergrößerung aufwiesen. Die Analyse der vergrößerten Lymphknoten von *B. henselae*-infizierten Mäusen ergab eine massive Zunahme der Gesamtzellzahl, eine Zunahme des prozentualen Anteils an B-Zellen, einen Anstieg der Anzahl proliferierender Zellen sowie eine bevorzugte Einwanderung von B-Zellen. Eine Auswirkung des *B. henselae*-Genotyps oder der Viabilität der Erreger auf die Entwicklung der Lymphadenopathie konnte nicht beobachtet werden. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen lassen auf einen maßgeblichen Einfluss von Typ I Interferonen auf den milden Verlauf nach Infektion mit *B. grahamii* schließen. Die genannten Ergebnisse werden im Folgenden ausführlicher diskutiert.

5.1 Etablierung eines Mausmodells der humanen KKK

5.1.1. Bartonellen-Isolate, Bartonellen-Spezies und Krankheitsverlauf

Zur s.c. Infektion von Mäusen mit *B. henselae* wurden in erster Linie Isolate aus dem Blut von Katzen verwendet, deren Besitzer Symptome einer KKK aufwiesen. Eine Anzucht aus den Patienten selbst war entweder erfolglos oder mangels Probenmaterials nicht durchführbar. Da Veränderungen von *B. henselae* nach Passagierung *in vitro* und *in vivo* bekannt sind (141, 246) und Primärisolaten eine höhere Virulenz zugeschrieben wird (201), wurden die verwendeten Stämme zwischen Primäranzucht und der Infektion von Mäusen möglichst kurz kultiviert und zudem mehrere verschiedene Isolate untersucht. Der Genotyp der verschiedenen Isolate, dessen Bedeutung für das Krankheitsgeschehen beim Menschen derzeit diskutiert wird (22, 70, 259), wurde in zwei PCRs zur Amplifikation der 16s rDNA (22) bestimmt. Einige der untersuchten Stämme vom Genotyp II zeigten dabei ähnlich den in der Originalarbeit (22) gezeigten Stämmen auch eine schwache Reaktion mit dem Typ I-spezifischen Primerpaar. Hinweise auf genomische Unterschiede zwischen den verwendeten Isolaten wurden auch durch sog. DNA-Fingerprint-Techniken und der Amplifikation eines Teiles des VirB/VirD4 Typ IV Sekretionssystems gewonnen. Letzteres war mit DNA aus allen Isolaten möglich, wenngleich mit unterschiedlicher Effizienz. Ebenfalls wurden Unterschiede in der Expression des Nichtfimbrien-Adhäsins BadA festgestellt, das für einige Stämme nicht nachweisbar war. Bei positiven Stämmen wies der Western-Immunoblot zum Nachweis von BadA mehrere zusätzliche Banden auf Höhe kleinerer Proteine auf, die möglicherweise aus der Denaturierung des mit 340kDa sehr großen nachzuweisenden Proteins und der Verwendung eines polyklonalen Antiserums resultierten. BadA vermittelt u.a. die Adhäsion der Bakterien an extrazelluläre Matrixproteine des Wirtes, bindet aber auch Substanzen wie Fibronectin in Nährböden zur Kultivierung der Bartonellen (208). Unterschiede im klinischen Verlauf nach Infektion von Mäusen mit verschiedenen Isolaten konnten nicht festgestellt werden. Sowohl Isolate beider Genotypen als auch BadA-exprimierende sowie BadA-negative Stämme (inkl. dem durch Genomanalyse sicher BadA-negativen Referenzstamm ATCC 49882 (208)) führten nach s.c. Infektion von Mäusen zu einer lokalen Lymphadenopathie, so dass kein Hinweis für eine vom Genotyp oder der Expression des BadA-Proteins abhängige Pathogenese besteht. Im Zusammenhang mit Infektionen des Menschen wurde durch *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) mehrerer *B. henselae*-Isolate ein gehäuftes Auftreten eines bestimmten Sequenztyps festgestellt (118). Die Sequenztypen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Isolate zur Infektion von Mäusen

sind nicht bekannt. Die weitergehenden Analysen der Veränderungen nach s.c. Infektion von Mäusen mit *B. henselae* wurden deswegen auf ein Isolat (Fr98/K8 bzw. K8aM) begrenzt.

Mehrere Veröffentlichungen berichten nach i.p. oder i.v. Infektion von Mäusen mit *B. henselae* in einer Dosis bis zu 3×10^8 cfu von einem komplikationslosen Verlauf der Infektion ohne Anzeichen einer Erkrankung (9, 124, 126, 201, 247), wenn man von einem Bericht über eine vorübergehende Lethargie der Mäuse 24 - 48h p.i. absieht (246). Auch s.c. infizierte C57BL/6 Mäuse zeigten bei einer vergleichbaren Infektionsdosis keine äußerlich erkennbaren Symptome einer Erkrankung; ab 2 - 3 Wochen p.i. wiesen sie jedoch einen deutlich vergrößerten Lymphknoten auf. Dies stimmt überein mit dem typischen Verlauf einer humanen KKK, die in der Mehrzahl der Fälle lokal auf einen Lymphknoten begrenzt bleibt. Beim Menschen in einigen Fällen (jeweils $< 2,5\%$ (163)) auftretende atypische Formen wie neurologische Störungen oder Osteomyelitis wurden möglicherweise aufgrund einer zu geringen Stichprobenzahl oder unauffälliger Symptomatik nicht beobachtet.

Die in der Literatur beschriebenen i.p. und i.v. Infektionen von Mäusen mit *B. henselae* führten zu einer raschen Elimination der Bakterien, so dass innerhalb von einer Woche p.i. keine Anzucht mehr möglich war. Nach s.c. Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *B. henselae* waren lebende Bakterien lediglich bis rund 3 Tage p.i. im drainierenden Lymphknoten und vereinzelt auch in der Milz nachweisbar, dann aber wurde ähnlich wie bei der humanen KKK (2, 88) eine rasche Degradierung der Bakterien und ihrer DNA beobachtet. Einzige Ausnahme blieb die Anzucht von *B. henselae* aus der Milz einer C57BL/6 Maus drei Wochen p.i.. Dieses Tier wies ein ungestörtes Allgemeinbefinden und nur geringfügig vergrößerte drainierende Lymphknoten auf. Auch nach s.c. Infektion war es somit, wenn auch sehr selten, möglich, dass *B. henselae* in die Milz von Mäusen gelangte und zu einer systemischen Infektion ähnlich den atypischen Formen der KKK des Menschen führte. Die überwiegende Mehrheit der Tiere entwickelte jedoch eine lokale und trotz einer großen Schwankungsbreite markante, deutlich über die Elimination der Bakterien hinaus bestehende Lymphadenopathie.

Es stellte sich die Frage, inwieweit die durch *B. henselae* nach s.c. Infektion von Mäusen induzierte, lokale und lang andauernde Lymphadenopathie spezifisch für dieses Bakterium ist, oder ob auch andere Bartonellen-Arten eine solche auslösen können. Aus diesem Grund wurden analog zur Infektion mit *B. henselae* auch Mäuse mit entweder *B. quintana*, einem sehr engen Verwandten von *B. henselae* (6), oder *B. grahamii*, einer bei verschiedenen

Kleinnagern auftretenden Art (25), infiziert. Dabei zeigte sich, dass nach s.c. Infektion von Mäusen mit einer dieser beiden Bartonellen-Arten bei der Mehrzahl der Tiere deutlich geringere Zunahmen von Gewicht und Zellzahl des drainierenden Lymphknotens auftraten als nach Infektion mit *B. henselae*. Vergleichbar war jedoch die rasche Elimination aller drei Arten in der Maus. Diese Ergebnisse lassen auf eine für *B. henselae* spezifische Induktion der markanten Lymphadenopathie schliessen. Die rasche Elimination von *B. grahamii* steht im Gegensatz zu der nach i.v. Infektion von Mäusen mit diesem Bakterium beobachteten Bakteriämie (132) und ist vermutlich durch den unterschiedlichen Infektionsweg, die niedrigere Dosis und/oder dem verschiedenen Stamm von *B. grahamii* bedingt (83).

5.1.2 Mechanismen der Erregerkontrolle

Die Ursachen der in der Regel raschen Elimination von *B. henselae* in der Maus sind unbekannt. Zwar wurde nach i.p. Infektion von Mäusen die Induktion einer Th1-ähnlichen Immunantwort beobachtet (9), der Nachweis lebender Bakterien ist jedoch bereits bevor diese zum Tragen kommt kaum mehr möglich. Auch konnten T-Zell-defiziente Mäuse *B. henselae* rasch kontrollieren (124, 246). In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen die Erregerkontrolle besonders bei Mäusen mit einem Defekt des angeborenen Immunsystems untersucht. Unerwarteterweise wurde bei diesen Tieren ebenfalls eine schnelle Elimination von *B. henselae* sowie eine darüber hinaus bestehende Lymphadenopathie beobachtet. So hatten Mäuse, die aufgrund einer Defizienz der phagozytären NADPH-Oxidase zahlreiche andere Mikroorganismen nicht durch reaktive Sauerstoffmoleküle kontrollieren können (27, 29, 71, 165), keine Probleme, *B. henselae* nach s.c. Infektion zu eliminieren. Ähnlich verhielt es sich mit Mäusen, die einen Defekt der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) aufwiesen, obwohl *in vitro* das durch iNOS freigesetzte NO an der Abtötung von *B. henselae* beteiligt ist (182). Auszuschließen ist eine Beteiligung dieser beiden Mechanismen an der Abtötung von *B. henselae in vivo* jedoch trotzdem nicht, da es möglich ist, dass jeweils der Ausfall des einen Mechanismus durch z. B. den anderen kompensiert wird. Ebenfalls in diesem Zusammenhang wurde der Einfluss von NKT-Zellen *in vivo* untersucht, da diese über das antigenpräsentierende Molekül CD1d v.a. Glykolipidantigene erkennen und durch die Freisetzung von Zytokinen u.a. in der Frühphase verschiedener Infektionen schutzvermittelnde Aufgaben erfüllen (94, 166, 229). Für Mäuse mit BALB/c Hintergrund, die aufgrund einer Defizienz von CD1d über keine NKT-Zellen verfügen, konnte ebenfalls keine Erregerpersistenz beobachtet werden. Trotzdem entwickelten auch sie eine lokale

Lymphadenopathie; NKT-Zellen scheinen somit keine entscheidende Funktion bei der Erregerkontrolle und Entstehung einer Lymphadenopathie zu haben. Dieses Ergebnis bedarf allerdings noch einer Bestätigung durch eine Wiederholung des Experiments. Gerade bei der NKT-Immundefizienz ist außerdem zu beachten, dass in Infektionsmodellen unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Mäuse auftreten können (94). Offen bleibt die Rolle des Komplementsystems bei der Elimination von *B. henselae in vivo*, zumal *in vitro* eine Anfälligkeit von *B. henselae* gegenüber komplementvermittelter Zelllyse beobachtet wurde (209). Die Untersuchung von RAG1-defizienten Mäusen, denen sowohl reife B- als auch T-Zellen fehlen, zeigte, dass auch diese Mäuse mit einem schweren Defekt des erworbenen Immunsystems in der Lage sind, die Erreger sehr schnell zu eliminieren. Sie entwickelten jedoch keine Lymphadenopathie, was belegt, dass B- und/oder T-Zellen an der Lymphknotenvergrößerung beteiligt sind.

B. henselae wurde also in allen bisher untersuchten immundefizienten Mausstämmen wie auch in den immunkompetenten Kontrolltieren rasch eliminiert. Auch bei Infektion von immunkompetenten Menschen mit *B. henselae* sind selten lebende Bakterien nachweisbar (2, 88), während immunsupprimierte Menschen (v.a. HIV-infizierte Patienten) eine Bakteriämie mit diesem Erreger entwickeln können (230). Im Maussystem wurde bisher kein Immundefekt nachgewiesen, der eine Elimination von *B. henselae* verhindert. Es ist denkbar, dass *B. henselae* aufgrund seiner hohen Wirtsspezifität nicht in der Maus überlebensfähig ist. Dagegen spricht allerdings, dass *B. henselae* zumindest aus der Milz einer Maus auch noch drei Wochen nach s.c. Infektion anzüchtbar war. Auch stellt die Anzucht von *B. henselae* aus Feliden, Katzenflöhen, Menschen und neuerdings auch aus Waldmäusen (*Apodemus sylvaticus*) (78) sowie der Nachweis von *B. henselae*-DNA in Blutproben Gewöhnlicher Schweinswale (159) die hohe Wirtsspezifität des Bakteriums in Frage. Zu beachten ist ferner das anspruchsvolle Wachstumsverhalten des Erregers und seine schwere Anzüchtbarkeit, die ebenfalls zu den meist negativen Kulturergebnissen beitragen könnte. Möglicherweise ist ein bisher noch nicht untersuchter Immunmechanismus für die Elimination von *B. henselae* in der Maus verantwortlich; Untersuchungen mit weiteren immundefizienten Mausstämmen könnten hierüber Aufschluss geben. Ein weiterer entscheidender Faktor für das Überleben des Erregers im Wirt ist sicherlich auch der Infektionsweg. So konnte für andere *Bartonella* Spezies im Tiermodell gezeigt werden, dass lediglich eine intravenöse, nicht jedoch eine subkutane Infektion zur Bakteriämie führt (83). Eine natürliche Infektion mit *B. henselae* tritt üblicherweise nach Kontakt zu Katzen, die intraerythrozytär bakteriämisch sind, oder mit Katzenflöhen bzw. Flohkot auf.

5.2 Charakteristika und Immunpathogenese der Lymphadenopathie nach *Bartonella*-Infektion

5.2.1 Lebende versus tote Erreger

Das Auftreten der Lymphadenopathie trotz der offensichtlich raschen Elimination von *B. henselae* wirft die Frage nach der Notwendigkeit lebender Bakterien für die Entstehung und Persistenz der Lymphadenopathie auf. Auch Mäuse, denen durch Hitze oder Ultraschallbehandlung abgetötete *B. henselae* injiziert wurden, entwickelten ab 2 - 3 Wochen p.i. eine auffällige Lymphknotenschwellung. Diese Ergebnisse widerlegen den Bedarf intakter Bakterien und Proteine für die Ausbildung der Lymphadenopathie. Gerade mit durch Ultraschallbehandlung lysierten *B. henselae* konnten auffällig konstante und lang anhaltende Lymphknotenvergrößerungen erzielt werden, was möglicherweise durch die leichtere Zugänglichkeit immunogener, stimulierender Bakterienbestandteile oder aber eine durch die Zerstörung der Bakterienstruktur schwächer ausfallende Induktion hemmender Mechanismen bedingt ist. Insgesamt waren innerhalb der Versuche mit lebenden oder durch Hitze inaktivierten *B. henselae* die Gewichtszunahmen der drainierenden Lymphknoten recht unterschiedlich ausgeprägt. Dies könnte durch leicht schwankende Infektionsdosen verursacht sein, da *B. henselae* durch die Neigung zur Autoagglutination nur schlecht homogen in Suspension zu bringen ist und damit eine gleichmäßige Dosierung nur bedingt möglich ist.

5.2.2 Histologische Charakteristika der Lymphadenopathie

Typisch für die KKK des Menschen ist histologisch eine B-Zell-assoziierte, granulomatöse, teils suppurative Lymphadenitis. Nach i.p. Infektion von Mäusen mit *B. henselae* wurden in der Leber eine Infiltration aus Lymphozyten und Monozyten und z.T. kleinere Granulome aus Lymphozyten, Monozyten und Epitheloidzellen ohne zentrale Nekrose beobachtet, die bei Mäusen auch bei anderen Infektionen selten vorkommt (9, 201). Nach s.c. Infektion von Mäusen mit *B. henselae* konnte für den drainierenden Lymphknoten eine Lymphadenitis mit folliculärer Hyperplasie, wie sie auch in der Frühphase der KKK des Menschen auftritt, diagnostiziert werden. Typische suppurative Granulome oder Nekrosen wurden im Gegensatz zum Krankheitsbild des Menschen auch nach s.c. Infektion nicht gefunden. Die Analyse der Zellkomposition des drainierenden Lymphknotens ergab eine relative Zunahme der B-Zellpopulation, wohingegen der relative Anteil der T-Zellen abnahm. Relative Veränderungen der Anteile anderer Zellpopulationen wurden nicht beobachtet. Gleichzeitig führte eine s.c.

Infektion mit *B. henselae* zu einer massiven Zunahme der Gesamtzellzahl des drainierenden Lymphknotens, so dass neben der bereits relativ gesehenen Zunahme an B-Zellen andere Zellpopulationen in ihrer absoluten Zahl ebenfalls zunahmen. Zusammen mit der fehlenden Lymphadenopathie nach s.c. Infektion von RAG1^{-/-} Mäusen deuten diese Daten auf eine mit einer starken Aktivierung von B-Zellen einhergehende Immunreaktion, sowie eine essentielle Rolle von reifen B- und T-Zellen bei der Entstehung der Lymphadenopathie hin.

Eine KKK des Menschen geht einher mit hohen Titern an *B. henselae* spezifischen Antikörpern im Serum (2). Analog hierzu wurden auch im Serum mit *B. henselae* infizierter Mäuse hohe Titer an *B. henselae* spezifischen Antikörpern (IgG) gefunden, die über mehrere Wochen anhielten. Dies entspricht auch den Ergebnissen nach i.p. oder i.v. Infektion von Mäusen mit *B. henselae* (124, 126). Die Funktion dieser Antikörper ist nicht bekannt.

5.2.3 Mögliche Mechanismen, die zur Lymphadenopathie von Mäusen nach Infektion mit Bartonellen beitragen

Die bisher diskutierten Ergebnisse sprechen für eine spezifisch durch *B. henselae* induzierte, massive Lymphadenopathie, die einhergeht mit einer Zunahme der Gesamtzellzahl des Lymphknotens und die trotz fehlender Nachweisbarkeit des Bakteriums für mehrere Wochen persistiert. Voraussetzung für eine solche Veränderung ist eine Induktion von proliferativen, inflammatorischen bzw. chemotaktischen und/oder die Apoptose hemmenden Vorgängen durch das Bakterium. Diese werden jedoch nur ausgelöst, wenn ein Erreger vom Immunsystem erkannt wird.

5.2.3.1 Stimulation von Immunzellen: Freisetzung von Effektormolekülen und Zytokinen

Bartonellen werden als wenig immunogene Mikroorganismen angesehen, da ihr LPS ein geringes endotoxisches Potential hat (266) und sie als fakultativ intrazelluläre Bakterien dazu fähig sind, Bakteriämien ohne Anzeichen einer Sepsis auszulösen (122). Trotzdem wurde für humane DC erst kürzlich beschrieben, dass diese *in vitro* nach Infektion mit *B. henselae* ATCC 49882 reifen und Zytokine freisetzen (248). Der Einfluss von Bartonellen auf Zellen des angeborenen Immunsystems der Maus wurde in der vorliegenden Arbeit durch Stimulation von mDC und Makrophagen, die aus Knochenmark generiert wurden, *in vitro* untersucht. Die Reifung muriner mDC nach Stimulation mit Bartonellen *in vitro* konnte

anhand der Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD80, CD86) gezeigt werden. Zusätzlich setzten sie, wie auch BM-MΦ, nach Stimulation mit Bartonellen *in vitro* NO und proinflammatorische Zytokine frei. Ersteres kann zur Abtötung der Bakterien beitragen (84, 182), aber auch regulatorischen Einfluss auf die Immunantwort nehmen (28). IL-12, ein Zytokin, das zur Induktion und Aufrechterhaltung einer Th1-Immunantwort wichtig und für die Kontrolle der Infektion mit intrazellulären Mikroorganismen wie *Leishmanien*, *Toxoplasma gondii*, *Mykobakterien* oder *Listeria monocytogenes* essentiell ist (115), war nach Stimulation von mDC und BM-MΦ mit Bartonellen *in vitro* nicht in seiner bioaktiven Form, die aus den zwei Untereinheiten p40 und p35 besteht, nachweisbar, sondern lediglich als IL-12p40. Diese Untereinheit ist auch Bestandteil von IL-23, kann aber auch Homodimere (IL-12p80) bilden. Eine mögliche Ursache für den fehlenden Nachweis des bioaktiven IL-12p70 *in vitro* könnte die fehlende zusätzliche Aktivierung der DC über T-Zellen bzw. CD40 sein, die für die Freisetzung großer Mengen dieses Zytokins notwendig ist (75). Aus Infektionsversuchen mit IL-12p40-defizienten Mäusen ist bekannt, dass diese empfindlicher gegenüber Infektionen mit *Mykobakterien*, *Salmonella enteritidis*, *Francisella tularensis*, *Leishmania major* und *Cryptococcus neoformans* sind (115). Über die Rolle von IL-12 nach Infektion von Mäusen mit Bartonellen *in vivo* ist bisher nichts bekannt.

Neben IL-12p40 wurde von mDC und BM-MΦ nach Stimulation mit Bartonellen auch TNF freigesetzt. Dieses könnte *in vivo* durch seine Wirkung auf Endothelzellen zum einen zu einer erhöhten Permeabilität der lokalen Gefäße und damit zu einer vermehrten Invasion von humoralen und zellulären Bestandteilen des Immunsystems beitragen, andererseits aber durch die Förderung der lokalen Blutgerinnung auch eine Ausbreitung der Bakterien verhindern (195).

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen lassen darauf schließen, dass Bartonellen durchaus von DC und Makrophagen erkannt werden, und *in vivo* über diese beiden Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems die adaptive Immunantwort nach Infektion mit Bartonellen beeinflusst werden könnte.

5.2.3.2 Immigration und Proliferation von Zellen

Kürzlich wurde eine Freisetzung der Chemokine CXCL8 (IL-8) und CXCL1, die die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten beeinflussen, durch humane DC nach Stimulation mit *B. henselae* *in vitro* beschrieben (249). Gleichzeitig setzten diese DC auch CXCL13 frei, das die Migration von v.a. B-Zellen durch die *High Endothelial Venules* (HEV) in

Lymphknoten fördert und auch in Granulomen bei der KKK nachgewiesen wurde (249). Diese Chemokine könnten bei einer Infektion mit *B. henselae* die Einwanderung von Zellen in den drainierenden Lymphknoten beeinflussen und wären eine mögliche Ursache des ungewöhnlich hohen Anteils an B-Zellen bei der KKK. Inwiefern nach Infektion von Mäusen mit *B. henselae* eine selektive Einwanderung bestimmter Zellpopulationen zu den beschriebenen Veränderungen des drainierenden Lymphknotens beiträgt, wurde durch den Transfer CFSE-markierter Milzzellen in infizierte Mäuse und anschließende Analyse der Zusammensetzung dieser markierten Zellen im Lymphknoten untersucht. Diese bestanden im drainierenden im Gegensatz zu einem nichtdrainierenden Lymphknoten derselben Maus in der Mehrheit aus B-Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es vorstellbar, dass die erhöhte Migration von B-Zellen, die durch die Freisetzung von Chemokinen ausgelöst werden könnte, entscheidend zur Ausbildung der Lymphadenopathie in *B. henselae*-infizierten Mäusen beiträgt. Weitere Untersuchungen zur Expression von Chemokinen in diesem Zusammenhang wurden bisher noch nicht durchgeführt; denkbar wäre jedoch eine Funktion von sog. inflammatorischen Chemokinen, aber auch das bereits erwähnte, die Migration von B-Zellen regulierende CXCL13 (173, 176, 249) könnte von Bedeutung sein.

Ein weiterer Faktor, der an der Zunahme der Gesamtzellzahl des drainierenden Lymphknotens nach s.c. Infektion von Mäusen mit *B. henselae* beteiligt sein könnte, ist eine gesteigerte Proliferation von Zellen, die durch den DNA-Einbau von 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) in den Lymphknoten von *B. henselae*-infizierten Mäusen nachgewiesen werden konnte. Auffällig war wiederum ein erhöhter Anteil an B-Zellen innerhalb der proliferierenden Zellen im drainierenden Lymphknoten. Der prozentuale Anteil proliferierender Zellen war bei *B. henselae*- und *B. grahamii*-infizierten Mäusen vergleichbar, während die absolute Zahl proliferierter Zellen nach Infektion mit *B. henselae* die nach Infektion mit *B. grahamii* deutlich übertraf. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben einer vermehrten Einwanderung von Zellen in den drainierenden Lymphknoten nach Infektion mit Bartonellen auch eine erhöhte lokale Proliferation für die Zunahme der Gesamtzellzahl verantwortlich ist. Neben B-Zellen, die relativ gesehen in einem solchen Lymphknoten überwiegen, kommt es im Zuge der Lymphknotenvergrößerung auch zu einer Zunahme der absoluten Anzahl an T-Zellen. Die Zusammensetzung der T-Zellen (CD4⁺ versus CD8⁺ Zellen) ändert sich durch die Infektion nicht. Die Spezifität der beteiligten T- und B-Zellen wurde nicht untersucht. Möglich ist eine Zunahme antigenspezifischer (*B. henselae*- oder evtl. auch Autoantigen-spezifischer) Zellen, aber auch eine unspezifische Expansion durch eine mitogene Wirkung von *B. henselae*.

B. henselae hat die Fähigkeit, die Apoptose von infizierten Endothelzellen in *in vitro*-Modellen der Angiogenese spezifisch zu inhibieren (129, 220). Daran beteiligt ist das VirB/VirD4 Typ IV Sekretionssystem; der zelluläre Signalweg, über den *B. henselae* dies auslöst, ist nicht bekannt. Eine Hemmung der Apoptose von Wirtszellen, die ebenfalls zu einer erhöhten Zellzahl im Rahmen einer Lymphadenopathie durch *B. henselae* beitragen könnte, wurde bisher nicht untersucht.

5.2.3.3 Aufrechterhaltung der Immunreaktion

Es stellt sich die Frage, welche bakteriellen Faktoren die beobachtete Aktivierung von Immunzellen auslösen und v.a. über mehrere Wochen p.i. aufrechterhalten. Für *B. henselae* wird ein direkter mitogener Effekt auf humane Endothelzellen diskutiert (64). Wie bereits erwähnt, können jedoch bereits wenige Tage nach s.c. Infektion von Mäusen keine Bakterien mehr aus dem drainierenden Lymphknoten angezüchtet werden. Auch der Nachweis von DNA ist drei Wochen p.i. bei rund der Hälfte der Tiere negativ. Lebende Bakterien oder Reste der injizierten Bakterien als Stimulans sind somit recht unwahrscheinlich, wenn auch nicht völlig auszuschließen. Ein möglicher stimulierender Faktor ist das Endotoxin Gram-negativer Bakterien. Von LPS ist außerdem bekannt, dass es murine B-Zellen über *Toll-like Receptor* (TLR) 4 zur Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen anregen kann (192). *B. henselae* weist jedoch ein recht geringes endotoxisches Potential auf und wirkt nur wenig aktivierend über TLR4 (266). Der LPS-Gehalt der Inokula, die in dieser Arbeit für Infektionsversuche verwendet wurden, lag jeweils unter 0,5 ng (Daten nicht gezeigt). Auch eine Aktivierung der Zellen über nicht abgebaute Proteine oder Membranbestandteile, die die Reaktion aufrechterhalten, wäre möglich. Für ein äußeres Membranprotein von *Neisseria* (164) oder eine Lipoprotein von *Mykobakterien* (117) wurde eine Aktivierung von B-Zellen über TLR2 beschrieben. Daneben können B-Zellen aber auch durch bakterielle Superantigene, die an den konservierten Teil des B-Zellrezeptors binden und so eine Aktivierung auslösen können (97), stimuliert werden. Da durch Hitze inaktivierte *B. henselae* eine vergleichbare Lymphadenopathie induzieren, ist ein natives Protein als ausschließliches Stimulans unwahrscheinlich. Vergleichbar mit der Wirkungsweise von unmethylierten CpG Oligonukleotiden, die über TLR9 zum einen kostimulatorisch autoreaktive B-Zellen aktivieren und damit die Toleranz aufheben oder auch immunregulatorisch eine Th1-Immunantwort und einen Wechsel der Immunglobulinklassen fördern können (192), ist

vorstellbar, dass DNA-Fragmente von Bartonellen im drainierenden Lymphknoten von infizierten Mäusen eine Stimulation und Expansion von B-Zellen auslösen.

Die genannten Mechanismen setzen entweder die Persistenz eines spezifischen Bartonellenproduktes oder eine unspezifische mitogene Wirkung von *B. henselae* voraus. Alternativ ist vorstellbar, dass *B. henselae* bzw. bakterielle Komponenten zwar den primären Induktor stellen, dadurch aber eine sekundäre, komplexe Immunreaktion ausgelöst wird, die schließlich durch andere Faktoren aufrechterhalten wird.

5.2.3.4 Typ I Interferone und ihre Funktion bei der Entstehung der Lymphadenopathie

Unabhängig von der Persistenz eines stimulatorischen Agens und/oder einer Dysregulation der Immunantwort als mögliche Ursachen der Lymphadenopathie stellt sich desweiteren die Frage nach der Ursache für die mildere Ausprägung der Lymphadenopathie nach s.c. Infektion mit *B. grahamii* im Vergleich zu *B. henselae*. Dieses Phänomen lässt sich entweder durch eine geringere stimulative Wirkung von *B. grahamii*, oder aber durch die gleichzeitige Induktion hemmender Effekte erklären. Die durchgeführten Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass Typ I Interferone (Interferon α/β) einen wesentlichen Einfluss auf den unterschiedlichen Verlauf der Infektion mit *B. henselae* bzw. *B. grahamii* nehmen.

Typ I Interferone werden vor allem bei viralen Infektionen induziert und sind durch ihre antiviralen Eigenschaften bekannt geworden (100). Sie beeinflussen aber auch den Verlauf einer Infektion mit pathogenen, intrazellulären Mikroorganismen (30, 63) wie Leishmanien (167) oder *Listeria monocytogenes* (13, 44, 184). In einem *in vitro* Modell der Angiogenese regulierten Endothelzellen nach Stimulation mit *B. henselae* Typ I Interferon-abhängige Gene hoch, während gleichzeitig durch Interferon- α/β inhibierte Gene vermindert exprimiert wurden. Eine Freisetzung von Typ I Interferon-Proteinen durch Endothelzellen war in diesem Modell nicht messbar (66).

Prinzipiell können sehr viele Zellarten Typ I Interferone freisetzen, besonders große Mengen werden jedoch durch plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) produziert. Dies wurde vor allem im Zusammenhang mit verschiedenen viralen Infektionen nachgewiesen (57). Daneben können pDC aber auch durch hypomethylierte Oligonukleotide mit CpG-Motiven, die ein Korrelat bakterieller DNA darstellen, zur Freisetzung von Typ I Interferon angeregt werden (108, 128, 140). Da pDC auch im Lymphknoten zu finden sind, wurde dieser Zelltyp näher untersucht.

Nach Stimulation von pDC mit lebenden Bartonellen *in vitro* wurden sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene Typ I Interferone exprimiert. *B. grahamii* erwies sich als der stärkere Induktor im Vergleich zu *B. henselae*. Zu beachten ist dabei die etwas höhere Teilungsrate von *B. grahamii* im Vergleich zu frühen Passagen von *B. henselae*; aber auch der schneller wachsende *B. henselae*-Referenzstamm induzierte bei gleicher Infektionsrate stets weniger Typ I Interferon als *B. grahamii*, was bereits auf einen möglichen Unterschied ihrer Expression bei einer Infektion hindeutete. Da bei viralen Infektionen die Freisetzung von Typ I Interferon durch pDC nicht von der Replikation der Viren abhängig ist (112, 139, 154), wurde auch die Wirkung abgetöteter Bartonellen auf pDC untersucht. Die Inaktivierung der Bakterien vor Stimulation der pDC reduzierte die freigesetzte Menge an Typ I Interferon. Der Unterschied zwischen lebenden und abgetöteten Bartonellen fiel am deutlichsten nach ultraschallbedingter Lyse der Bartonellen aus, insbesondere bei *B. grahamii*. Dies mag zum einen mit der höheren Dosis an Stimulans durch die Teilung lebender Bartonellen während der 48-stündigen Kokultivierung zusammenhängen. Der Unterschied in der stimulativen Kapazität von hitzeinaktivierten vs. ultraschall-lysierten Bartonellen deutet aber auch darauf hin, dass die intakte Struktur der Bakterien die Freisetzung der Typ I Interferone besser induziert. Die Tatsache, dass trotz Hitzeinaktivierung eine Induktion von Typ I Interferonen möglich war, spricht gegen eine durch ein natives Bartonellen-Protein vermittelte Stimulation.

Weitere Experimente gingen der Frage nach, welche der von pDC exprimierten Rezeptoren an der Induktion von Typ I Interferonen durch Bartonellen beteiligt sind. Bereits bekannt ist die hohe Expression von TLR9 und TLR7 in pDC, während TLR3 nicht exprimiert wird (119, 252). Zumindest auf mRNA-Ebene wurde die Expression weiterer TLRs durch pDC gezeigt (119). TLRs erkennen als sog. *Pattern Recognition Receptors* zahlreiche konservierte Komponenten von Mikroorganismen. Derzeit bekannte Liganden von TLR7 bzw. TLR9 sind Einzelstrang-RNA bzw. hypomethylierte DNA und das Malariapigment Hemozoin (53, 119). In Abhängigkeit von diesen endosomal vorliegenden Rezeptoren TLR9 (112, 138, 139, 154) und/oder TLR7 (69, 155) und unter Benutzung des Adaptormoleküls MyD88 produzieren pDC nach viraler Infektion Typ I Interferon (4, 194). Nach Stimulation von pDC mit LPS, einem Liganden von TLR4, wurde eine Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen (aber keine Freisetzung von Typ I Interferonen) gemessen (12). Über TLR4 wäre eine MyD88-unabhängige Signaltransduktion und Freisetzung von Interferon- α/β über das Adaptormolekül *TIR Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- β* (TRIF) möglich (265). Die Abhängigkeit der Bartonellen-induzierten Typ I Interferon-Produktion durch pDC von diesen

beiden bekannten TLR-Signalwegen sowie von TLR9, TLR7 und TLR4 wurde durch entsprechend defiziente pDC sowie eine Präinkubation mit Chloroquin analysiert. Chloroquin verhindert eine Ansäuerung der Endosomen und die Stimulation der dort vorliegenden Rezeptoren TLR7 und TLR9 (154, 158). Die Freisetzung von Typ I Interferon durch Bartonellen war komplett von MyD88 und teilweise auch von TLR9 abhängig. Die TLR9-unabhängige Freisetzung von Typ I Interferon ließ sich durch Chloroquin vollständig aufheben. Die Ergebnisse mit TRIF- bzw. TLR4-defizienten pDC wiesen auf keine signifikante Abhängigkeit von diesen beiden Molekülen hin. Die durch Chloroquin inhibierbare und MyD88-abhängige, jedoch TRIF-unabhängige Typ I Interferon-Induktion durch Bartonellen spricht für eine Signalvermittlung über die endosomalen Rezeptoren TLR9 und TLR7. Zur Aktivierung von TLR9 durch aufgereinigte bakterielle DNA sind Konzentrationen von 1 – 100 µg/ml, die einer sehr großen Anzahl von Bakterien entsprechen (rund 10^9 – 10^{10} Bakterien/ml), notwendig (60). Die Zugabe von Substanzen, die die Aufnahme der DNA in die Zelle erleichtern, ermöglicht eine Aktivierung von TLR9 auch mit niedrigeren DNA-Konzentrationen (60). Bartonellen-DNA (1 µg/ml) induzierte ebenfalls die Freisetzung von Typ I Interferon durch pDC, wenn auch in geringeren Mengen als eine vergleichbare Anzahl lebender Bartonellen. Dies könnte daran liegen, dass neben DNA noch ein weiterer (ko)stimulatorischer Faktor bzw. mit TLR7 ein weiterer Rezeptor an der Typ I Interferon-Induktion beteiligt ist, und/oder dass reine DNA durch die Zelle schlechter aufgenommen wird und so am intrazellulären TLR9 niedrigere Konzentrationen erreicht werden (60). Von anderen intrazellulären Bakterien wie *L. monocytogenes* ist bekannt, dass sie zu einer TLR-, NOD2-, und damit auch MyD88-unabhängigen Induktion von Typ I Interferonen in Makrophagen fähig sind (63, 185, 234). Verantwortlich für diese Induktion ist vermutlich zytosolische DNA. In diesem Zusammenhang wurde auch die Abhängigkeit der Typ I Interferon-Induktion durch *Legionella pneumophila* von einem Typ IV Sekretionssystem gezeigt (233). Durch dieses bakterielle Transportsystem könnte DNA des Bakteriums in das Zytosol gelangen. Auch *B. henselae* weist zwei Typ IV Sekretionssysteme auf. Ein aktiver Transport von DNA oder anderen Liganden über diese Typ IV Sekretionssysteme durch lebende Bakterien könnte die geringere Induktion durch abgetötete Bartonellen bzw. aufgereinigte DNA ebenfalls erklären. Da es sich jedoch lediglich um eine Reduktion der Typ I Interferon-Produktion handelt, kann der aktive Transfer von Liganden über Typ IV Sekretionssysteme nicht ausschließlich für die Induktion der Typ I Interferone verantwortlich sein.

Die Auswirkungen von Typ I Interferonen auf bakterielle Infektionen *in vivo* sind je nach Pathogen von Vor- oder Nachteil (30, 63). Bakterien wie *Chlamydia* spp., *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* oder *Escherichia* spp. stimulieren die Synthese von Typ I Interferonen durch verschiedene Zelltypen (63). Eine Infektion von Mäusen mit *S. typhimurium* verläuft bei Gabe von Typ I Interferonen mit einer reduzierten Letalität (40), vermutlich aufgrund der Induktion einer IL-12-unabhängigen Stimulation von NK- und Th1-Zellen zur Produktion von IFN- γ (89). Weitere Effekte von Typ I Interferonen, die die Abwehr von Bakterien unterstützen können, führen zu einer Reifung und Aktivierung von DC und damit zu einer erhöhten Antigenpräsentation, T-Zellaktivierung und Entwicklung einer adaptiven Immunantwort (63). Zusätzlich können Typ I Interferone auch die angeborene Immunantwort verstärken, in dem sie die Expression antimikrobieller Gene wie z.B. iNOS in Makrophagen fördern (30). Es ist weiterhin bekannt, dass Typ I Interferone die Resistenz von Mäusen gegenüber einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* erhöhen (254). Andererseits tragen Typ I Interferone in der Frühphase einer Erstinfektion von Mäusen mit *L. monocytogenes* zu einer höheren Bakterienlast bei und haben in diesem Modell eine negative Auswirkung auf den Infektionsverlauf (13, 44, 184). Auch auf Infektionen mit Mykobakterien haben Typ I Interferone einen Einfluss, der jedoch sehr vom jeweiligen Bakterienstamm, der Schwere der Infektion und dem Zusammenspiel verschiedener Immuneffektormechanismen abhängig ist (58, 67, 161, 242). Welche Rolle Typ I Interferone *in vivo* bei einer s.c. Infektion von Mäusen mit Bartonellen spielen, wurde durch Typ I Interferon-Rezeptor-defiziente Mäuse, die mit entweder *B. henselae* oder *B. grahamii* infiziert wurden, untersucht. Im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren zeigten diese Mäuse keine Unterschiede im klinischen Verlauf, eine Erregerpersistenz konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Nach Infektion mit *B. henselae* entwickelten auch die defizienten Mäuse eine deutliche Lymphadenopathie. Auffällig war jedoch der Unterschied zwischen Wildtyp- und Typ I Interferon-Rezeptor-defizienten Mäusen nach s.c. Infektion mit *B. grahamii*: während erstere wie erwartet nur eine milde Veränderung des Lymphknotens aufwiesen, entwickelten Typ I Interferon-Rezeptor-defiziente Mäuse nach Infektion mit *B. grahamii* eine markante Lymphadenopathie. Im Zusammenhang mit der starken Induktion von Typ I Interferonen nach Stimulation mit *B. grahamii* *in vitro* deuten diese Ergebnisse auf eine Freisetzung von Typ I Interferonen auch *in vivo* hin, die die Entwicklung der Lymphadenopathie hemmt. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass eine Lyse von *B. henselae* zu einer Reduktion der Typ I Interferon-Freisetzung *in vitro* führt, gleichzeitig aber *in vivo* eine sehr konstant ausgeprägte, markante Lymphadenopathie hervorruft. Es ist somit wahrscheinlich, dass nach

s.c. Infektion von Mäusen mit Bartonellen Typ I Interferone freigesetzt werden, die zwar keinen offensichtlichen Einfluss auf die Elimination des Erregers nehmen, aber zumindest nach Infektion mit *B. grahamii* die Entstehung einer massiven, lang andauernden Lymphadenopathie inhibieren. Möglich ist hierbei sowohl eine direkte Wirkung von Typ I Interferonen auf die Genexpression in verschiedenen Zelltypen als auch eine sekundäre Wirkung aktivierter Zellen auf die weitere Immunreaktion, wodurch letztendlich Mechanismen, die an der Entstehung der Lymphadenopathie beteiligt sind - wie z.B. eine vermehrte Zellproliferation oder die bereits diskutierte Freisetzung von Chemokinen - gehemmt werden. Es ist bekannt, dass Typ I Interferone unterschiedlichste, immunstimulatorische wie immunsupprimierende Effekte auslösen, die z.T. vom Interferon- α/β -Subtyp, der Induktion von weiteren Zytokinen oder von Konzentration und Zeitpunkt der Typ I Interferon-Einwirkung abhängen (30). Durch Interferon- α/β kann die Reifung und Funktion von verschiedenen DC-Populationen sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden (30), wodurch sich im Falle der Infektion mit Bartonellen aufgrund der veränderten Antigenpräsentation und Zytokinfreisetzung eine Lymphadenopathie unterschiedlich entwickeln könnte. Ebenfalls bekannt sind Effekte von Typ I Interferonen auf T- und B-Zellen. So können sie z.B. eine Proliferation von T-Zellen hemmen (170, 236) oder eine direkte Wirkung auf die Homöostase und Funktion dieser Zellen haben (3, 105, 147, 148). In zukünftigen Experimenten sollen deshalb die Expression von Typ I Interferonen im Verlauf einer s.c. Infektion mit Bartonellen im drainierenden Lymphknoten analysiert und mögliche Zielzellen und Wirkungsmechanismen von Interferon- α/β im Mausmodell der KKK untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Bartonella henselae ist ein kleines Gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium, das in seinem feline Reservoir zur klinisch inapparenten Bakteriämie fähig ist. Bei akzidentieller Infektion eines Menschen löst es abhängig vom individuellen Immunstatus entweder Symptome einer Katzenkratzkrankheit (KKK) oder vasoproliferative Veränderungen aus.

Die KKK ist eine der häufigsten Zoonosen immunkompetenter Menschen weltweit und manifestiert sich typischerweise in Form einer lang andauernden, regionalen Lymphknotenschwellung, in der nur sehr selten lebende Bakterien nachweisbar sind. Nach mehreren Wochen bis Monaten heilt die typische KKK zwar von selbst aus, sie stellt aber eine wichtige Differentialdiagnose zu anderen infektiösen oder zu malignen Prozessen dar. Eine Immunpathogenese der Erkrankung wird vermutet, das Wissen hierzu ist jedoch in Folge der eingeschränkten Untersuchungsmöglichkeiten am humanen Patienten begrenzt. Mehr Möglichkeiten würde ein Tiermodell bieten. Ziel dieser Arbeit war deswegen die Charakterisierung des Verlaufs einer subkutanen Infektion von Mäusen mit Bartonellen. Der Schwerpunkt lag auf der sich entwickelnden lokalen Lymphadenopathie als mögliches Pendant der KKK des Menschen.

Mäuse, die mit einer hohen Dosis *B. henselae* s.c. infiziert wurden, bildeten bei ungestörtem Allgemeinbefinden Bartonellen-spezifische Antikörper sowie eine auffällige Vergrößerung des drainierenden Lymphknotens, die mit einer Zunahme von Gewicht und Zellzahl einherging. *B. henselae* war nur innerhalb der ersten Woche aus dem drainierenden Lymphknoten anzüchtbar, während das Maximum der Lymphknotenschwellung erst rund drei Wochen p.i. auftrat. Veränderte Lymphknoten wiesen histologisch eine folliculäre Hyperplasie und Lymphadenitis auf; die stark erhöhte Gesamtzellzahl der Lymphknoten war in ihrer Zusammensetzung von einer relativen Zunahme der B-Zellpopulation gekennzeichnet. Diese Veränderungen waren unabhängig von der Vitalität der inokulierten Bakterien und traten bei allen untersuchten Isolaten von *B. henselae* auf. Auch konnten verschiedene immundefiziente Mausstämme den Erreger kontrollieren und entwickelten (mit Ausnahme der B- und T-Zell-defizienten RAG1^{-/-} Mäuse) ebenfalls eine auffällige Lymphadenopathie. Im Vergleich zur Infektion mit anderen *Bartonella* Spezies (*B. grahamii* bzw. *B. quintana*) war die Lymphadenopathie nach Infektion mit *B. henselae* deutlich stärker ausgeprägt und länger anhaltend.

In *in vitro* Versuchen wurde nach Stimulation von dendritischen Zellen und Makrophagen mit Bartonellen sowohl eine Reifung der Zellen als auch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen beobachtet. Eine Beteiligung dieser Zellen des angeborenen

Immunsystems bei der Abwehr der Erreger und der Induktion der Lymphadenopathie ist somit möglich. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass sowohl eine vermehrte Proliferation als auch ein vermehrtes Einwandern von Zellen (in beiden Fällen bevorzugt B-Zellen) an der Erhöhung der Zellzahl des drainierenden Lymphknotens nach s.c. Infektion mit *B. henselae* ursächlich beteiligt sind. Als ein möglicher regulativer Faktor hierfür wurde die Rolle von Typ I Interferonen untersucht. Plasmazytoide dendritische Zellen setzten *in vitro* nach Stimulation mit Bartonellen MyD88-abhängig große Mengen an Typ I Interferonen frei. *In vivo* zeigte sich, dass Mäuse mit einer Defizienz des Typ I Interferon-Rezeptors auch nach s.c. Infektion mit *B. grahamii* eine auffällige Lymphadenopathie entwickelten, während dieses Bakterium in Wildtyp-Mäusen nur milde Symptome hervorrief. Diese Ergebnisse lassen auf einen hemmenden Effekt von Typ I Interferonen auf die Entwicklung der Lymphadenopathie schließen.

Es zeigte sich somit, dass *B. henselae* auch in der Maus eine spezifische lokale Lymphadenopathie induziert. An deren Entwicklung sind sowohl eine Proliferation als auch die Einwanderung von Immunzellen beteiligt. Die lediglich milden Symptome nach einer vergleichbaren Infektion mit *B. grahamii* werden möglicherweise durch eine inhibitorische Wirkung von Typ I Interferonen kontrolliert.

Summary

Bartonella henselae is a small fastidious, Gram-negative bacterium which in general causes a sub-clinical intra-erythrocytic bacteraemia in its feline reservoir host. When accidentally infecting humans it elicits cat scratch disease (CSD) in immunocompetent hosts and vasculoproliferative diseases in immunocompromised. CSD belongs to the most common zoonoses occurring throughout the world. Its characteristic clinical manifestation is a long-lasting, but self-healing enlargement of the draining lymph node with specific granuloma formation, which rarely contains cultivable *Bartonella*. The clinical relevance of CSD results from the necessity to exclude other infectious or malignant processes. An immunopathogenic origin of the lymphadenopathy is assumed, yet details are rare due to the limited analysis in human patients. Further analysis of an animal model could lead to an improved understanding. Aim of the present study was to characterise the course of a subcutaneous infection of mice with *Bartonella* species. It especially focused on a local lymphadenopathy as a possible correlate of human CSD.

Mice infected with a high dose of *B. henselae* developed anti-*Bartonella* antibodies and a striking swelling of the draining lymph node that persisted for a longer period of time and was more severe compared to the lymphadenopathy seen after infection with other *Bartonella* species. *B. henselae* was only recultivable for up to 7 days, whereas the lymph node swelling reached its maximum at 3-4 weeks after challenge. The histological examination revealed a follicular hyperplasia and lymphadenitis. In addition, the increase of the absolute cell numbers per lymph node was associated with a significant increase of the proportion of B-cells. This lymphadenopathy was independent of the *B. henselae* strain and did not require viable bacteria. Furthermore, several immunodeficient mouse strains were still able to control the bacteria, but nevertheless allowed for the development of a striking lymphadenopathy.

In *in vitro* studies bone marrow-derived macrophages and myeloid dendritic cells exposed to viable or non-viable *Bartonella* released several proinflammatory cytokines or underwent maturation, respectively. Further *in vivo* studies revealed that both a pronounced cell-proliferation as well as an enhanced cell-influx (in both cases preferentially B-cells) contributed to the increased absolute cell numbers per lymph node following s.c. infection with *B. henselae*. As plasmacytoid dendritic cells exposed to *Bartonella* released high amounts of type I interferon in a MyD88-dependant manner *in vitro*, the role of type I interferon in the mouse model of *Bartonella* infection were of interest. While there was no difference between type I interferon receptor-deficient or wild type mice infected with *B.*

henselae, subcutaneous infection with *B. grahamii* led to a striking swelling of the draining lymph node only in type I interferon receptor-deficient mice.

Thus, *B. henselae* induces a specific local lymphadenopathy in mice. In the pathogenesis of this lymphadenopathy both lymphoproliferation and immune cell recruitment are involved. The only mild lymphadenopathy seen after infection of mice with another *Bartonella* species may be due to an inhibitory effect of type I interferon.

7 Literaturverzeichnis

1. **Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi, and S. Akira.** 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **9**:143-50.
2. **Agan, B. K., and M. J. Dolan.** 2002. Laboratory diagnosis of Bartonella infections. *Clin Lab Med* **22**:937-62.
3. **Aichele, P., H. Unsoeld, M. Koschella, O. Schweier, U. Kalinke, and S. Vucikuja.** 2006. Cutting edge: CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion. *J Immunol* **176**:4525-9.
4. **Akira, S., and K. Takeda.** 2004. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol* **327**:581-9.
5. **Al-Matar, M. J., R. E. Petty, D. A. Cabral, L. B. Tucker, B. Peyvandi, J. Prendiville, J. Forbes, R. Cairns, and R. Rothstein.** 2002. Rheumatic manifestations of Bartonella infection in 2 children. *J Rheumatol* **29**:184-6.
6. **Alsmark, C. M., A. C. Frank, E. O. Karlberg, B. A. Legault, D. H. Ardell, B. Canback, A. S. Eriksson, A. K. Naslund, S. A. Handley, M. Huvet, B. La Scola, M. Holmberg, and S. G. Andersson.** 2004. The louse-borne human pathogen Bartonella quintana is a genomic derivative of the zoonotic agent Bartonella henselae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9716-21.
7. **Anderson, B., K. Sims, R. Regnery, L. Robinson, M. J. Schmidt, S. Goral, C. Hager, and K. Edwards.** 1994. Detection of Rochalimaea henselae DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *J Clin Microbiol* **32**:942-8.
8. **Anderson, B. E., and M. A. Neuman.** 1997. Bartonella spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* **10**:203-19.
9. **Arvand, M., R. Ignatius, T. Regnath, H. Hahn, and M. E. Mielke.** 2001. Bartonella henselae-specific cell-mediated immune responses display a predominantly Th1 phenotype in experimentally infected C57BL/6 mice. *Infect Immun* **69**:6427-33.
10. **Arvand, M., M. E. Mielke, K. Sterry, and H. Hahn.** 1998. Detection of specific cellular immune response to Bartonella henselae in a patient with cat scratch disease. *Clin Infect Dis* **27**:1533-4.
11. **Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri.** 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* **2**:1144-50.
12. **Asselin-Paturel, C., G. Brizard, K. Chemin, A. Boonstra, A. O'Garra, A. Vicari, and G. Trinchieri.** 2005. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med* **201**:1157-67.

13. **Auerbuch, V., D. G. Brockstedt, N. Meyer-Morse, M. O'Riordan, and D. A. Portnoy.** 2004. Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* **200**:527-33.
14. **Avidor, B., M. Graidy, G. Efrat, C. Leibowitz, G. Shapira, A. Schattner, O. Zimhony, and M. Giladi.** 2004. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. *J Clin Microbiol* **42**:3462-8.
15. **Ayoub, E. M., J. McBride, M. Schmiederer, and B. Anderson.** 2002. Role of *Bartonella henselae* in the etiology of Henoch-Schonlein purpura. *Pediatr Infect Dis J* **21**:28-31.
16. **Banchereau, J., and R. M. Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-52.
17. **Barton, A.** 1909. Descripcion de elementos endoglobulares en los enfermos de Fiebre de Verruga. *Cron. Med. Lima* **26**:7.
18. **Bass, J. W., J. M. Vincent, and D. A. Person.** 1997. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J* **16**:163-79.
19. **Batterman, H. J., J. A. Peek, J. S. Loutit, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1995. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun* **63**:4553-6.
20. **Benson, L. A., S. Kar, G. McLaughlin, and G. M. Ihler.** 1986. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect Immun* **54**:347-53.
21. **Bergmans, A. M., J. W. Groothedde, J. F. Schellekens, J. D. van Embden, J. M. Ossewaarde, and L. M. Schouls.** 1995. Etiology of cat scratch disease: comparison of polymerase chain reaction detection of *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) and *Afipia felis* DNA with serology and skin tests. *J Infect Dis* **171**:916-23.
22. **Bergmans, A. M., J. F. Schellekens, J. D. van Embden, and L. M. Schouls.** 1996. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *J Clin Microbiol* **34**:254-60.
23. **Biron, C. A.** 2001. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* **14**:661-4.
24. **Birtles, R. J., T. G. Harrison, and D. H. Molyneux.** 1994. *Grahamella* in small woodland mammals in the U.K.: isolation, prevalence and host specificity. *Ann Trop Med Parasitol* **88**:317-27.
25. **Birtles, R. J., T. G. Harrison, N. A. Saunders, and D. H. Molyneux.** 1995. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**:1-8.
26. **Bjorck, P.** 2001. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* **98**:3520-6.

27. **Blos, M., U. Schleicher, F. J. Soares Rocha, U. Meissner, M. Rollinghoff, and C. Bogdan.** 2003. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Immunol* **33**:1224-34.
28. **Bogdan, C.** 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2**:907-16.
29. **Bogdan, C.** 2004. Reactive oxygen and reactive nitrogen metabolites as effector molecules against infectious pathogens, p. 357-396. *In* S. H. E. Kaufmann, R. Medzhitov, and S. Gordon (ed.), *The innate immune response to infection*. ASM Press.
30. **Bogdan, C., J. Mattner, and U. Schleicher.** 2004. The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol Rev* **202**:33-48.
31. **Boulouis, H. J., F. Barrat, D. Bermond, F. Bernex, D. Thibault, R. Heller, J. J. Fontaine, Y. Piemont, and B. B. Chomel.** 2001. Kinetics of *Bartonella birtlesii* infection in experimentally infected mice and pathogenic effect on reproductive functions. *Infect Immun* **69**:5313-7.
32. **Boulouis, H. J., C. C. Chang, J. B. Henn, R. W. Kasten, and B. B. Chomel.** 2005. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res* **36**:383-410.
33. **Bown, K. J., M. Bennet, and M. Begon.** 2004. Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. *Emerg Infect Dis* **10**:684-7.
34. **Breitschwerdt, E. B., K. R. Blann, M. E. Stebbins, K. R. Munana, M. G. Davidson, H. A. Jackson, and M. D. Willard.** 2004. Clinicopathological Abnormalities and Treatment Response in 24 Dogs Seroreactive to *Bartonella vinsonii* (berkhoffii) Antigens. *J Am Anim Hosp Assoc* **40**:92-101.
35. **Breitschwerdt, E. B., and D. L. Kordick.** 2000. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev* **13**:428-38.
36. **Brenner, D. J., D. G. Hollis, C. W. Moss, C. K. English, G. S. Hall, J. Vincent, J. Radosevic, K. A. Birkness, W. F. Bibb, F. D. Quinn, and et al.** 1991. Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies. *J Clin Microbiol* **29**:2450-60.
37. **Brenner, D. J., S. P. O'Connor, H. H. Winkler, and A. G. Steigerwalt.** 1993. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. *Int J Syst Bacteriol* **43**:777-86.
38. **Brenner, S. A., J. A. Rooney, P. Manzewitsch, and R. L. Regnery.** 1997. Isolation of *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae*: effects of methods of blood collection and handling. *J Clin Microbiol* **35**:544-7.

39. **Bruno, L., T. Seidl, and A. Lanzavecchia.** 2001. Mouse pre-immunocytes as non-proliferating multipotent precursors of macrophages, interferon-producing cells, CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**:3403-12.
40. **Bukholm, G., B. P. Berdal, C. Haug, and M. Degre.** 1984. Mouse fibroblast interferon modifies Salmonella typhimurium infection in infant mice. *Infect Immun* **45**:62-6.
41. **Burgess, A. W., and B. E. Anderson.** 1998. Outer membrane proteins of Bartonella henselae and their interaction with human endothelial cells. *Microb Pathog* **25**:157-64.
42. **Burgess, A. W., J. Y. Paquet, J. J. Letesson, and B. E. Anderson.** 2000. Isolation, sequencing and expression of Bartonella henselae omp43 and predicted membrane topology of the deduced protein. *Microb Pathog* **29**:73-80.
43. **Carithers, H. A.** 1985. Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. *Am J Dis Child* **139**:1124-33.
44. **Carrero, J. A., B. Calderon, and E. R. Unanue.** 2004. Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to Listeria infection. *J Exp Med* **200**:535-40.
45. **Chang, C. C., B. B. Chomel, R. W. Kasten, V. Romano, and N. Tietze.** 2001. Molecular evidence of Bartonella spp. in questing adult Ixodes pacificus ticks in California. *J Clin Microbiol* **39**:1221-6.
46. **Chang, C. C., B. B. Chomel, R. W. Kasten, J. W. Tappero, M. A. Sanchez, and J. E. Koehler.** 2002. Molecular epidemiology of Bartonella henselae infection in human immunodeficiency virus-infected patients and their cat contacts, using pulsed-field gel electrophoresis and genotyping. *J Infect Dis* **186**:1733-9.
47. **Cherwinski, H. M., J. H. Schumacher, K. D. Brown, and T. R. Mosmann.** 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* **166**:1229-44.
48. **Chomel, B. B., R. C. Abbott, R. W. Kasten, K. A. Floyd-Hawkins, P. H. Kass, C. A. Glaser, N. C. Pedersen, and J. E. Koehler.** 1995. Bartonella henselae prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol* **33**:2445-50.
49. **Chomel, B. B., R. W. Kasten, K. Floyd-Hawkins, B. Chi, K. Yamamoto, J. Roberts-Wilson, A. N. Gurfield, R. C. Abbott, N. C. Pedersen, and J. E. Koehler.** 1996. Experimental transmission of Bartonella henselae by the cat flea. *J Clin Microbiol* **34**:1952-6.
50. **Chomel, B. B., R. W. Kasten, J. E. Sykes, H. J. Boulouis, and E. B. Breitschwerdt.** 2003. Clinical impact of persistent Bartonella bacteremia in humans and animals. *Ann N Y Acad Sci* **990**:267-78.
51. **Chomel, B. B., A. C. Wey, and R. W. Kasten.** 2003. Isolation of Bartonella washoensis from a dog with mitral valve endocarditis. *J Clin Microbiol* **41**:5327-32.

52. **Chung, C. Y., R. W. Kasten, S. M. Paff, B. A. Van Horn, M. Vayssier-Taussat, H. J. Boulouis, and B. B. Chomel.** 2004. Bartonella spp. DNA associated with biting flies from California. *Emerg Infect Dis* **10**:1311-3.
53. **Coban, C., K. J. Ishii, T. Kawai, H. Hemmi, S. Sato, S. Uematsu, M. Yamamoto, O. Takeuchi, S. Itagaki, N. Kumar, T. Horii, and S. Akira.** 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* **201**:19-25.
54. **Cockerell, C. J., P. R. Bergstresser, C. Myrie-Williams, and P. M. Tierno.** 1990. Bacillary epithelioid angiomatosis occurring in an immunocompetent individual. *Arch Dermatol* **126**:787-90.
55. **Coleman, S. A., and M. F. Minnick.** 2001. Establishing a direct role for the Bartonella bacilliformis invasion-associated locus B (IalB) protein in human erythrocyte parasitism. *Infect Immun* **69**:4373-81.
56. **Colonna, M., A. Krug, and M. Cella.** 2002. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol* **14**:373-9.
57. **Colonna, M., G. Trinchieri, and Y. J. Liu.** 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**:1219-26.
58. **Cooper, A. M., J. E. Pearl, J. V. Brooks, S. Ehlers, and I. M. Orme.** 2000. Expression of the nitric oxide synthase 2 gene is not essential for early control of Mycobacterium tuberculosis in the murine lung. *Infect Immun* **68**:6879-82.
59. **Cosma, C. L., D. R. Sherman, and L. Ramakrishnan.** 2003. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* **57**:641-76.
60. **Dalpke, A., J. Frank, M. Peter, and K. Heeg.** 2006. Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect Immun* **74**:940-6.
61. **Daly, J. S., M. G. Worthington, D. J. Brenner, C. W. Moss, D. G. Hollis, R. S. Weyant, A. G. Steigerwalt, R. E. Weaver, M. I. Daneshvar, and S. P. O'Connor.** 1993. Rochalimaea elizabethae sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol* **31**:872-81.
62. **Debre, R., M. Lamy, M. L. Jammet, L. Costil, and P. Mozziconacci.** 1950. [Cat scratch disease.]. *Sem Hop* **26**:1895-1904.
63. **Decker, T., M. Muller, and S. Stockinger.** 2005. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* **5**:675-87.
64. **Dehio, C.** 2005. Bartonella-host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nat Rev Microbiol* **3**:621-31.
65. **Dehio, C.** 2004. Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **58**:365-90.
66. **Dehio, M., M. Quebatte, S. Foser, and U. Certa.** 2005. The transcriptional response of human endothelial cells to infection with Bartonella henselae is dominated by genes

- controlling innate immune responses, cell cycle, and vascular remodelling. *Thromb Haemost* **94**:347-61.
67. **Denis, M.** 1991. Recombinant murine beta interferon enhances resistance of mice to systemic *Mycobacterium avium* infection. *Infect Immun* **59**:1857-9.
68. **Derrick, S. C., and G. M. Ihler.** 2001. Deformin, a substance found in *Bartonella bacilliformis* culture supernatants, is a small, hydrophobic molecule with an affinity for albumin. *Blood Cells Mol Dis* **27**:1013-9.
69. **Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa.** 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**:1529-31.
70. **Dillon, B., J. Valenzuela, R. Don, D. Blanckenberg, D. I. Wigney, R. Malik, A. J. Morris, J. M. Robson, and J. Iredell.** 2002. Limited diversity among human isolates of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol* **40**:4691-9.
71. **Dinauer, M. C., M. B. Deck, and E. R. Unanue.** 1997. Mice lacking reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity show increased susceptibility to early infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* **158**:5581-3.
72. **Dolan, M. J., M. T. Wong, R. L. Regnery, J. H. Jorgensen, M. Garcia, J. Peters, and D. Drehner.** 1993. Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. *Ann Intern Med* **118**:331-6.
73. **Drancourt, M., R. Birtles, G. Chaumentin, F. Vandenesch, J. Etienne, and D. Raoult.** 1996. New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet* **347**:441-3.
74. **Droz, S., B. Chi, E. Horn, A. G. Steigerwalt, A. M. Whitney, and D. J. Brenner.** 1999. *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. *J Clin Microbiol* **37**:1117-22.
75. **Edwards, A. D., S. P. Manickasingham, R. Sporri, S. S. Diebold, O. Schulz, A. Sher, T. Kaisho, S. Akira, and C. Reis e Sousa.** 2002. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol* **169**:3652-60.
76. **Ehrenborg, C., L. Wesslen, A. Jakobson, G. Friman, and M. Holmberg.** 2000. Sequence variation in the *ftsZ* gene of *Bartonella henselae* isolates and clinical samples. *J Clin Microbiol* **38**:682-7.
77. **Ellis, B. A., R. L. Regnery, L. Beati, F. Bacellar, M. Rood, G. G. Glass, E. Marston, T. G. Ksiazek, D. Jones, and J. E. Childs.** 1999. Rats of the genus *Rattus* are reservoir hosts for pathogenic *Bartonella* species: an Old World origin for a New World disease? *J Infect Dis* **180**:220-4.
78. **Engbaek, K., and P. A. Lawson.** 2004. Identification of *Bartonella* species in rodents, shrews and cats in Denmark: detection of two *B. henselae* variants, one in cats and the other in the long-tailed field mouse. *Apmis* **112**:336-41.

79. **English, C. K., D. J. Wear, A. M. Margileth, C. R. Lissner, and G. P. Walsh.** 1988. Cat-scratch disease. Isolation and culture of the bacterial agent. *Jama* **259**:1347-52.
80. **Erridge, C., E. Bennett-Guerrero, and I. R. Poxton.** 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* **4**:837-51.
81. **Facchetti, F., C. Agostini, M. Chilosi, A. Mombello, P. Grigolato, and J. J. Van den Oord.** 1992. Suppurative granulomatous lymphadenitis. Immunohistochemical evidence for a B-cell-associated granuloma. *Am J Surg Pathol* **16**:955-61.
82. **Facchetti, F., W. Vermi, S. Fiorentini, M. Chilosi, A. Caruso, M. Duse, L. D. Notarangelo, and R. Badolato.** 1999. Expression of inducible nitric oxide synthase in human granulomas and histiocytic reactions. *Am J Pathol* **154**:145-52.
83. **Falch, C.** 2004. Infektionsverlauf und Wirtsspezifität von *Bartonella* spp. im Tiermodell sowie Erstbeschreibung des kryptischen plasmids pBGR1 aus *Bartonella grahamii*. Doktorarbeit. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
84. **Fang, F. C.** 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* **2**:820-32.
85. **Finkelstein, J. L., T. P. Brown, K. L. O'Reilly, J. Wedincamp, Jr., and L. D. Foil.** 2002. Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* **39**:915-9.
86. **Foil, L., E. Andress, R. L. Freeland, A. F. Roy, R. Rutledge, P. C. Triche, and K. L. O'Reilly.** 1998. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. *J Med Entomol* **35**:625-8.
87. **Fournier, P. E., H. Lelievre, S. J. Eykyn, J. L. Mainardi, T. J. Marrie, F. Bruneel, C. Roure, J. Nash, D. Clave, E. James, C. Benoit-Lemercier, L. Deforges, H. Tissot-Dupont, and D. Raoult.** 2001. Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine (Baltimore)* **80**:245-51.
88. **Fournier, P. E., J. Robson, Z. Zeaiter, R. McDougall, S. Byrne, and D. Raoult.** 2002. Improved culture from lymph nodes of patients with cat scratch disease and genotypic characterization of *Bartonella henselae* isolates in Australia. *J Clin Microbiol* **40**:3620-4.
89. **Freudenberg, M. A., T. Merlin, C. Kalis, Y. Chvatchko, H. Stubig, and C. Galanos.** 2002. Cutting edge: a murine, IL-12-independent pathway of IFN-gamma induction by gram-negative bacteria based on STAT4 activation by Type I IFN and IL-18 signaling. *J Immunol* **169**:1665-8.
90. **Fumarola, D., S. Pece, R. Fumarulo, R. Petruzzelli, B. Greco, G. Giuliani, A. B. Maffione, and E. Jirillo.** 1994. Downregulation of human polymorphonuclear cell activities exerted by microorganisms belonging to the alpha-2 subgroup of Proteobacteria (*Afipia felis* and *Rochalimaea henselae*). *Immunopharmacol Immunotoxicol* **16**:449-61.

91. **Gerber, M. A., P. Rapacz, S. S. Kalter, and M. Ballow.** 1986. Cell-mediated immunity in cat-scratch disease. *J Allergy Clin Immunol* **78**:887-90.
92. **Giladi, M., B. Avidor, Y. Kletter, S. Abulafia, L. N. Slater, D. F. Welch, D. J. Brenner, A. G. Steigerwalt, A. M. Whitney, and M. Ephros.** 1998. Cat scratch disease: the rare role of *Afipia felis*. *J Clin Microbiol* **36**:2499-502.
93. **Glaus, T., R. Hofmann-Lehmann, C. Greene, B. Glaus, C. Wolfensberger, and H. Lutz.** 1997. Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol* **35**:2883-5.
94. **Godfrey, D. I., and M. Kronenberg.** 2004. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* **114**:1379-88.
95. **Goldenberger, D., R. Zbinden, I. Perschil, and M. Altwegg.** 1996. [Detection of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*/B. *quintana* by polymerase chain reaction (PCR)]. *Schweiz Med Wochenschr* **126**:207-13.
96. **Goodman, R. A., and E. B. Breitschwerdt.** 2005. Clinicopathologic findings in dogs seroreactive to *Bartonella henselae* antigens. *Am J Vet Res* **66**:2060-4.
97. **Goodyear, C. S., and G. J. Silverman.** 2005. B cell superantigens: a microbe's answer to innate-like B cells and natural antibodies. *Springer Semin Immunopathol* **26**:463-84.
98. **Graser, Y., I. Klare, E. Halle, R. Gantenberg, P. Buchholz, H. D. Jacobi, W. Presber, and G. Schonian.** 1993. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol* **31**:2417-20.
99. **Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum.** 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**:131-8.
100. **Gresser, I.** 1997. Wherefore interferon? *J Leukoc Biol* **61**:567-74.
101. **Guptill, L.** 2003. Bartonellosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **33**:809-25.
102. **Guptill, L., L. Slater, C. C. Wu, T. L. Lin, L. T. Glickman, D. F. Welch, and H. HogenEsch.** 1997. Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. *J Infect Dis* **176**:206-16.
103. **Guptill, L., L. N. Slater, C. C. Wu, T. L. Lin, L. T. Glickman, D. F. Welch, J. Tobolski, and H. HogenEsch.** 1998. Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of *Bartonella henselae* in experimentally infected cats. *Vet Immunol Immunopathol* **65**:177-89.
104. **Hashkes, P. J., A. Trabulsi, and M. H. Passo.** 1996. Systemic cat-scratch disease presenting as leukocytoclastic vasculitis. *Pediatr Infect Dis J* **15**:93-5.
105. **Havenar-Daughton, C., G. A. Kolumam, and K. Murali-Krishna.** 2006. Cutting Edge: The direct action of type I IFN on CD4 T cells is critical for sustaining clonal expansion in response to a viral but not a bacterial infection. *J Immunol* **176**:3315-9.

106. **Hayem, F., S. Chacar, and G. Hayem.** 1996. Bartonella henselae infection mimicking systemic onset juvenile chronic arthritis in a 2 1/2-year-old girl. *J Rheumatol* **23**:1263-5.
107. **Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer.** 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**:1526-9.
108. **Hemmi, H., T. Kaisho, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol* **170**:3059-64.
109. **Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira.** 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**:740-5.
110. **Hendrix, L. R., and K. Kiss.** 2003. Studies on the identification of deforming factor from Bartonella bacilliformis. *Ann N Y Acad Sci* **990**:596-604.
111. **Higgins, J. A., S. Radulovic, D. C. Jaworski, and A. F. Azad.** 1996. Acquisition of the cat scratch disease agent Bartonella henselae by cat fleas (Siphonaptera:Pulicidae). *J Med Entomol* **33**:490-5.
112. **Hochrein, H., B. Schlatter, M. O'Keeffe, C. Wagner, F. Schmitz, M. Schiemann, S. Bauer, M. Suter, and H. Wagner.** 2004. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:11416-21.
113. **Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler.** 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**:743-8.
114. **Hoebe, K., X. Du, J. Goode, N. Mann, and B. Beutler.** 2003. Lps2: a new locus required for responses to lipopolysaccharide, revealed by germline mutagenesis and phenotypic screening. *J Endotoxin Res* **9**:250-5.
115. **Holscher, C.** 2004. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **193**:1-17.
116. **Hoss-Homfeld, A., E. C. Zwarthoff, and R. Zawatzky.** 1989. Cell type specific expression and regulation of murine interferon alpha and beta genes. *Virology* **173**:539-50.
117. **Hovav, A. H., L. Davidovitch, G. Nussbaum, J. Mullerad, Y. Fishman, and H. Bercovier.** 2004. Mitogenicity of the recombinant mycobacterial 27-kilodalton lipoprotein is not connected to its antiprotective effect. *Infect Immun* **72**:3383-90.
118. **Iredell, J., D. Blanckenberg, M. Arvand, S. Grauling, E. J. Feil, and R. J. Birtles.** 2003. Characterization of the natural population of Bartonella henselae by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **41**:5071-9.

119. **Iwasaki, A., and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**:987-95.
120. **Jackson, L. A., B. A. Perkins, and J. D. Wenger.** 1993. Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am J Public Health* **83**:1707-11.
121. **Jacobs, R. F., and G. E. Schutze.** 1998. Bartonella henselae as a cause of prolonged fever and fever of unknown origin in children. *Clin Infect Dis* **26**:80-4.
122. **Jacomo, V., P. J. Kelly, and D. Raoult.** 2002. Natural history of Bartonella infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diagn Lab Immunol* **9**:8-18.
123. **Janssens, S., and R. Beyaert.** 2003. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* **16**:637-46.
124. **Kabeya, H., E. Tsunoda, S. Maruyama, and T. Mikami.** 2003. Immune responses of immunocompetent and immunocompromised mice experimentally infected with Bartonella henselae. *J Vet Med Sci* **65**:479-84.
125. **Karem, K. L.** 2000. Immune aspects of Bartonella. *Crit Rev Microbiol* **26**:133-45.
126. **Karem, K. L., K. A. Dubois, S. L. McGill, and R. L. Regnery.** 1999. Characterization of Bartonella henselae-specific immunity in BALB/c mice. *Immunology* **97**:352-8.
127. **Kerkhoff, F. T., A. M. Bergmans, A. van Der Zee, and A. Rothova.** 1999. Demonstration of Bartonella grahamii DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. *J Clin Microbiol* **37**:4034-8.
128. **Kerkmann, M., S. Rothenfusser, V. Hornung, A. Towarowski, M. Wagner, A. Sarris, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann.** 2003. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **170**:4465-74.
129. **Kirby, J. E., and D. M. Nekorchuk.** 2002. Bartonella-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4656-61.
130. **Koehler, J. E., C. A. Glaser, and J. W. Tappero.** 1994. Rochalimaea henselae infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *Jama* **271**:531-5.
131. **Koehler, J. E., M. A. Sanchez, C. S. Garrido, M. J. Whitfeld, F. M. Chen, T. G. Berger, M. C. Rodriguez-Barradas, P. E. LeBoit, and J. W. Tappero.** 1997. Molecular epidemiology of bartonella infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N Engl J Med* **337**:1876-83.
132. **Koesling, J., T. Aebischer, C. Falch, R. Schulein, and C. Dehio.** 2001. Cutting edge: antibody-mediated cessation of hemotropic infection by the intraerythrocytic mouse pathogen Bartonella grahamii. *J Immunol* **167**:11-4.
133. **Kojima, M., S. Nakamura, Y. Hosomura, K. Shimizu, Y. Kurabayashi, H. Itoh, K. Yoshida, Y. Ohno, A. Kaneko, S. Asano, and et al.** 1993. Abscess-forming granulomatous lymphadenitis: histological typing of suppurative granulomas and

- clinicopathological findings with special reference to cat scratch disease. *Acta Pathol Jpn* **43**:11-7.
134. **Kojima, M., S. Nakamura, Y. Kurabayashi, H. Itoh, K. Yoshida, S. Asano, T. Suchi, and T. Joshita.** 1995. Suppurative lesions without prominent epithelioid cell response in abscess-forming granulomatous lymphadenitis. *Pathol Res Pract* **191**:1072-77.
135. **Kordick, D. L., T. T. Brown, K. Shin, and E. B. Breitschwerdt.** 1999. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J Clin Microbiol* **37**:1536-47.
136. **Kordick, D. L., E. J. Hilyard, T. L. Hadfield, K. H. Wilson, A. G. Steigerwalt, D. J. Brenner, and E. B. Breitschwerdt.** 1997. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J Clin Microbiol* **35**:1813-8.
137. **Kosoy, M., M. Murray, R. D. Gilmore, Jr., Y. Bai, and K. L. Gage.** 2003. *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *J Clin Microbiol* **41**:645-50.
138. **Krug, A., A. R. French, W. Barchet, J. A. Fischer, A. Dzionek, J. T. Pingel, M. M. Orihuela, S. Akira, W. M. Yokoyama, and M. Colonna.** 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**:107-19.
139. **Krug, A., G. D. Luker, W. Barchet, D. A. Leib, S. Akira, and M. Colonna.** 2004. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**:1433-7.
140. **Krug, A., S. Rothenfusser, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, S. Blackwell, Z. K. Ballas, S. Endres, A. M. Krieg, and G. Hartmann.** 2001. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**:2154-63.
141. **Kyme, P., B. Dillon, and J. Iredell.** 2003. Phase variation in *Bartonella henselae*. *Microbiology* **149**:621-9.
142. **La Scola, B., and D. Raoult.** 1999. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). *J Clin Microbiol* **37**:1899-905.
143. **La Scola, B., Z. Zeaiter, A. Khamis, and D. Raoult.** 2003. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. *Trends Microbiol* **11**:318-21.
144. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
145. **Lappin, M. R., D. L. Kordick, and E. B. Breitschwerdt.** 2000. *Bartonella* spp antibodies and DNA in aqueous humour of cats. *J Feline Med Surg* **2**:61-8.

146. **Laubach, V. E., E. G. Shesely, O. Smithies, and P. A. Sherman.** 1995. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:10688-92.
147. **Le Bon, A., V. Durand, E. Kamphuis, C. Thompson, S. Bulfone-Paus, C. Rossmann, U. Kalinke, and D. F. Tough.** 2006. Direct Stimulation of T Cells by Type I IFN Enhances the CD8⁺ T Cell Response during Cross-Priming. *J Immunol* **176**:4682-9.
148. **Le Bon, A., C. Thompson, E. Kamphuis, V. Durand, C. Rossmann, U. Kalinke, and D. F. Tough.** 2006. Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. *J Immunol* **176**:2074-8.
149. **LeBoit, P. E., T. G. Berger, B. M. Egbert, J. H. Beckstead, T. S. Yen, and M. H. Stoler.** 1989. Bacillary angiomatosis. The histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease. *Am J Surg Pathol* **13**:909-20.
150. **LeBoit, P. E., T. G. Berger, B. M. Egbert, T. S. Yen, M. H. Stoler, T. A. Bonfiglio, J. A. Strauchen, C. K. English, and D. J. Wear.** 1988. Epithelioid haemangioma-like vascular proliferation in AIDS: manifestation of cat scratch disease bacillus infection? *Lancet* **1**:960-3.
151. **Liblau, R. S., S. M. Singer, and H. O. McDevitt.** 1995. Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* **16**:34-8.
152. **Litwin, C. M., and J. M. Johnson.** 2005. Identification, cloning, and expression of the CAMP-like factor autotransporter gene (*cfa*) of *Bartonella henselae*. *Infect Immun* **73**:4205-13.
153. **Lucey, D., M. J. Dolan, C. W. Moss, M. Garcia, D. G. Hollis, S. Wegner, G. Morgan, R. Almeida, D. Leong, K. S. Greisen, and et al.** 1992. Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. *Clin Infect Dis* **14**:683-8.
154. **Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, and A. Iwasaki.** 2003. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**:513-20.
155. **Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, and R. A. Flavell.** 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:5598-603.
156. **Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler.** 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**:77-92.
157. **MacDonald, K. A., B. B. Chomel, M. D. Kittleson, R. W. Kasten, W. P. Thomas, and P. Pesavento.** 2004. A prospective study of canine infective endocarditis in northern California (1999-2001): emergence of *Bartonella* as a prevalent etiologic agent. *J Vet Intern Med* **18**:56-64.

158. **Macfarlane, D. E., and L. Manzel.** 1998. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol* **160**:1122-31.
159. **Maggi, R. G., C. A. Harms, A. A. Hohn, D. A. Pabst, W. A. McLellan, W. J. Walton, D. S. Rotstein, and E. B. Breitschwerdt.** 2005. *Bartonella henselae* in Porpoise blood. *Emerg Infect Dis* **11**:1894-8.
160. **Maillard, R., B. Grimard, S. Chastant-Maillard, B. Chomel, T. Delcroix, C. Gandoin, C. Bouillin, L. Halos, M. Vayssier-Taussat, and H. J. Boulouis.** 2006. Effects of cow age and pregnancy on bartonella infection in a herd of dairy cattle. *J Clin Microbiol* **44**:42-6.
161. **Manca, C., L. Tsenova, A. Bergtold, S. Freeman, M. Tovey, J. M. Musser, C. E. Barry, 3rd, V. H. Freedman, and G. Kaplan.** 2001. Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5752-7.
162. **Manders, S. M.** 1996. Bacillary angiomatosis. *Clin Dermatol* **14**:295-9.
163. **Margileth, A. M.** 1993. Cat scratch disease. *Adv Pediatr Infect Dis* **8**:1-21.
164. **Massari, P., P. Henneke, Y. Ho, E. Latz, D. T. Golenbock, and L. M. Wetzler.** 2002. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* **168**:1533-7.
165. **Mastroeni, P., A. Vazquez-Torres, F. C. Fang, Y. Xu, S. Khan, C. E. Hormaeche, and G. Dougan.** 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J Exp Med* **192**:237-48.
166. **Mattner, J., N. Donhauser, G. Werner-Felmayer, and C. Bogdan.** 2006. NKT cells mediate organ-specific resistance against *Leishmania major* infection. *Microbes Infect* **8**:354-62.
167. **Mattner, J., A. Wandersee-Steinhauser, A. Pahl, M. Rollinghoff, G. R. Majeau, P. S. Hochman, and C. Bogdan.** 2004. Protection against progressive leishmaniasis by IFN-beta. *J Immunol* **172**:7574-82.
168. **Maurin, M., V. Roux, A. Stein, F. Ferrier, R. Viraben, and D. Raoult.** 1994. Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with bacillary angiomatosis. *J Clin Microbiol* **32**:1166-71.
169. **McGill, S. L., R. L. Regnery, and K. L. Karem.** 1998. Characterization of human immunoglobulin (Ig) isotype and IgG subclass response to *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun* **66**:5915-20.

170. **McNally, J. M., C. C. Zarozinski, M. Y. Lin, M. A. Brehm, H. D. Chen, and R. M. Welsh.** 2001. Attrition of bystander CD8 T cells during virus-induced T-cell and interferon responses. *J Virol* **75**:5965-76.
171. **Mexas, A. M., S. I. Hancock, and E. B. Breitschwerdt.** 2002. Bartonella henselae and Bartonella elizabethae as potential canine pathogens. *J Clin Microbiol* **40**:4670-4.
172. **Mitchell, S. J., and M. F. Minnick.** 1995. Characterization of a two-gene locus from Bartonella bacilliformis associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infect Immun* **63**:1552-62.
173. **Miyasaka, M., and T. Tanaka.** 2004. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* **4**:360-70.
174. **Molia, S., B. B. Chomel, R. W. Kasten, C. M. Leutenegger, B. R. Steele, L. Marker, J. S. Martenson, D. F. Keet, R. G. Bengis, R. P. Peterson, L. Munson, and S. J. O'Brien.** 2004. Prevalence of Bartonella infection in wild African lions (Panthera leo) and cheetahs (Acinonyx jubatus). *Vet Microbiol* **100**:31-41.
175. **Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou.** 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**:869-77.
176. **Moser, B., M. Wolf, A. Walz, and P. Loetscher.** 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* **25**:75-84.
177. **Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman.** 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**:2348-57.
178. **Muller, U., U. Steinhoff, L. F. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet.** 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**:1918-21.
179. **Munder, M., K. Eichmann, and M. Modolell.** 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* **160**:5347-54.
180. **Murali-Krishna, K., J. D. Altman, M. Suresh, D. J. Sourdive, A. J. Zajac, J. D. Miller, J. Slansky, and R. Ahmed.** 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**:177-87.
181. **Murray, H. W.** 1990. Gamma interferon, cytokine-induced macrophage activation, and antimicrobial host defense. In vitro, in animal models, and in humans. *Diagn Microbiol Infect Dis* **13**:411-21.
182. **Musso, T., R. Badolato, D. Ravarino, S. Stornello, P. Panzanelli, C. Merlino, D. Savoia, R. Cavallo, A. N. Ponzi, and M. Zucca.** 2001. Interaction of Bartonella henselae with the murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response. *Infect Immun* **69**:5974-80.

183. **Nakano, H., M. Yanagita, and M. D. Gunn.** 2001. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **194**:1171-8.
184. **O'Connell, R. M., S. K. Saha, S. A. Vaidya, K. W. Bruhn, G. A. Miranda, B. Zarnegar, A. K. Perry, B. O. Nguyen, T. F. Lane, T. Taniguchi, J. F. Miller, and G. Cheng.** 2004. Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* **200**:437-45.
185. **O'Connell, R. M., S. A. Vaidya, A. K. Perry, S. K. Saha, P. W. Dempsey, and G. Cheng.** 2005. Immune activation of type I IFNs by *Listeria monocytogenes* occurs independently of TLR4, TLR2, and receptor interacting protein 2 but involves TNFR-associated NF kappa B kinase-binding kinase 1. *J Immunol* **174**:1602-7.
186. **O'Garra, A., and K. Murphy.** 1993. T-cell subsets in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **5**:880-6.
187. **Ohl, M. E., and D. H. Spach.** 2000. *Bartonella quintana* and urban trench fever. *Clin Infect Dis* **31**:131-5.
188. **O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch, and K. Shortman.** 2003. Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* **101**:1453-9.
189. **O'Reilly, K. L., R. W. Bauer, R. L. Freeland, L. D. Foil, K. J. Hughes, K. R. Rohde, A. F. Roy, R. W. Stout, and P. C. Triche.** 1999. Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of *Bartonella henselae* (LSU16). *Infect Immun* **67**:3066-72.
190. **O'Rourke, L. G., C. Pitulle, B. C. Hegarty, S. Kraycirik, K. A. Killary, P. Grosenstein, J. W. Brown, and E. B. Breitschwerdt.** 2005. *Bartonella quintana* in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Emerg Infect Dis* **11**:1931-4.
191. **Papadopoulos, N. G., D. Gourgiotis, A. Bossios, A. Fretzayas, M. Moustaki, and T. Karpathios.** 2001. Circulating cytokines in patients with cat scratch disease. *Clin Infect Dis* **33**:e54-6.
192. **Peng, S. L.** 2005. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **17**:230-6.
193. **Perkocha, L. A., S. M. Geaghan, T. S. Yen, S. L. Nishimura, S. P. Chan, R. Garcia-Kennedy, G. Honda, A. C. Stoloff, H. Z. Klein, R. L. Goldman, and et al.** 1990. Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatitis in association with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **323**:1581-6.
194. **Perry, A. K., G. Chen, D. Zheng, H. Tang, and G. Cheng.** 2005. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res* **15**:407-22.
195. **Pfeffer, K.** 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**:185-91.

196. **Pollock, J. D., D. A. Williams, M. A. Gifford, L. L. Li, X. Du, J. Fisherman, S. H. Orkin, C. M. Doerschuk, and M. C. Dinauer.** 1995. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet* **9**:202-9.
197. **Poltorak, A., T. Merlin, P. J. Nielsen, O. Sandra, I. Smirnova, I. Schupp, T. Boehm, C. Galanos, and M. A. Freudenberg.** 2001. A point mutation in the IL-12R beta 2 gene underlies the IL-12 unresponsiveness of Lps-defective C57BL/10ScCr mice. *J Immunol* **167**:2106-11.
198. **Powrie, F., and R. L. Coffman.** 1993. Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol Today* **14**:270-4.
199. **Raoult, D., F. Roblot, J. M. Rolain, J. M. Besnier, J. Loulergue, F. Bastides, and P. Choutet.** 2006. First isolation of *Bartonella alsatica* from a valve of a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol* **44**:278-9.
200. **Raoult, D., H. Tissot Dupont, and M. Enea-Mutillod.** 1994. Positive predictive value of *Rochalimaea henselae* antibodies in the diagnosis of cat-scratch disease. *Clin Infect Dis* **19**:355.
201. **Regnath, T., M. E. Mielke, M. Arvand, and H. Hahn.** 1998. Murine model of *Bartonella henselae* infection in the immunocompetent host. *Infect Immun* **66**:5534-6.
202. **Regnery, R., M. Martin, and J. Olson.** 1992. Naturally occurring "Rochalimaea henselae" infection in domestic cat. *Lancet* **340**:557-8.
203. **Regnery, R. L., B. E. Anderson, J. E. Clarridge, 3rd, M. C. Rodriguez-Barradas, D. C. Jones, and J. H. Carr.** 1992. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* **30**:265-74.
204. **Regnery, R. L., J. G. Olson, B. A. Perkins, and W. Bibb.** 1992. Serological response to "Rochalimaea henselae" antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* **339**:1443-5.
205. **Relman, D. A., J. S. Loutit, T. M. Schmidt, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1990. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* **323**:1573-80.
206. **Resto-Ruiz, S., A. Burgess, and B. E. Anderson.** 2003. The role of the host immune response in pathogenesis of *Bartonella henselae*. *DNA Cell Biol* **22**:431-40.
207. **Ridder, G. J., C. C. Boedeker, K. Technau-Ihling, R. Grunow, and A. Sander.** 2002. Role of cat-scratch disease in lymphadenopathy in the head and neck. *Clin Infect Dis* **35**:643-9.
208. **Riess, T., S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Walzlein, U. Ehehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf.** 2004. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* **200**:1267-78.

209. **Rodriguez-Barradas, M. C., J. C. Bandres, R. J. Hamill, J. Trial, J. E. Clarridge, 3rd, R. E. Baughn, and R. D. Rossen.** 1995. In vitro evaluation of the role of humoral immunity against *Bartonella henselae*. *Infect Immun* **63**:2367-70.
210. **Rolain, J. M., P. Brouqui, J. E. Koehler, C. Maguina, M. J. Dolan, and D. Raoult.** 2004. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1921-33.
211. **Rolain, J. M., C. Foucault, R. Guieu, B. La Scola, P. Brouqui, and D. Raoult.** 2002. *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *Lancet* **360**:226-8.
212. **Rolain, J. M., M. Franc, B. Davoust, and D. Raoult.** 2003. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerg Infect Dis* **9**:338-42.
213. **Roux, V., S. J. Eykyn, S. Wyllie, and D. Raoult.** 2000. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. *J Clin Microbiol* **38**:1698-700.
214. **Sander, A., T. Kaliebe, and W. Brecht.** 1996. [*Bartonella* (*Rochalimaea*) infections: cat-scratch disease and bacillary angiomatosis]. *Dtsch Med Wochenschr* **121**:65-9.
215. **Sander, A., S. Kretzer, W. Brecht, K. Oberle, and S. Bereswill.** 2000. Hemin-dependent growth and hemin binding of *Bartonella henselae*. *FEMS Microbiol Lett* **189**:55-9.
216. **Sander, A., M. Posselt, N. Bohm, M. Ruess, and M. Altwegg.** 1999. Detection of *Bartonella henselae* DNA by two different PCR assays and determination of the genotypes of strains involved in histologically defined cat scratch disease. *J Clin Microbiol* **37**:993-7.
217. **Sander, A., M. Ruess, S. Bereswill, M. Schuppler, and B. Steinbrueckner.** 1998. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *J Clin Microbiol* **36**:2973-81.
218. **Sander, A., A. Zagrosek, W. Brecht, E. Schiltz, Y. Piemont, C. Lanz, and C. Dehio.** 2000. Characterization of *Bartonella clarridgeiae* flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin antibodies in patients with lymphadenopathy. *J Clin Microbiol* **38**:2943-8.
219. **Sanogo, Y. O., Z. Zeaiter, G. Caruso, F. Merola, S. Shpynov, P. Brouqui, and D. Raoult.** 2003. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg Infect Dis* **9**:329-32.
220. **Schmid, M. C., R. Schulein, M. Dehio, G. Denecker, I. Carena, and C. Dehio.** 2004. The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol Microbiol* **52**:81-92.
221. **Schroder, G., and C. Dehio.** 2005. Virulence-associated type IV secretion systems of *Bartonella*. *Trends Microbiol* **13**:336-42.

-
222. **Schulein, R., and C. Dehio.** 2002. The VirB/VirD4 type IV secretion system of Bartonella is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol Microbiol* **46**:1053-67.
223. **Schulein, R., P. Guye, T. A. Rhomberg, M. C. Schmid, G. Schroder, A. C. Vergunst, I. Carena, and C. Dehio.** 2005. A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of Bartonella henselae into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:856-61.
224. **Schulein, R., A. Seubert, C. Gille, C. Lanz, Y. Hansmann, Y. Piemont, and C. Dehio.** 2001. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen Bartonella. *J Exp Med* **193**:1077-86.
225. **Schulkind, M. L., and E. M. Ayoub.** 1974. Cell-mediated immunity in cat-scratch disease. *J Pediatr* **85**:199-203.
226. **Schweyer, S., and A. Fayyazi.** 2002. Activation and apoptosis of macrophages in cat scratch disease. *J Pathol* **198**:534-40.
227. **Seubert, A., R. Hiestand, F. de la Cruz, and C. Dehio.** 2003. A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol* **49**:1253-66.
228. **Sher, A., and R. L. Coffman.** 1992. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol* **10**:385-409.
229. **Sköld, M., and S. M. Behar.** 2003. Role of CD1d-restricted NKT cells in microbial immunity. *Infect Immun* **71**:5447-55.
230. **Slater, L. N., D. F. Welch, D. Hensel, and D. W. Coody.** 1990. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N Engl J Med* **323**:1587-93.
231. **Slater, L. N., D. F. Welch, and K. W. Min.** 1992. Rochalimaea henselae causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. *Arch Intern Med* **152**:602-6.
232. **Smiley, S. T., M. H. Kaplan, and M. J. Grusby.** 1997. Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science* **275**:977-9.
233. **Stetson, D. B., and R. Medzhitov.** 2006. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* **24**:93-103.
234. **Stockinger, S., B. Reutterer, B. Schaljo, C. Schellack, S. Brunner, T. Materna, M. Yamamoto, S. Akira, T. Taniguchi, P. J. Murray, M. Muller, and T. Decker.** 2004. IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism. *J Immunol* **173**:7416-25.
235. **Stoler, M. H., T. A. Bonfiglio, R. T. Steigbigel, and M. Pereira.** 1983. An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol* **80**:714-8.

236. **Sun, S., X. Zhang, D. F. Tough, and J. Sprent.** 1998. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J Exp Med* **188**:2335-42.
237. **Szelc-Kelly, C. M., S. Goral, G. I. Perez-Perez, B. A. Perkins, R. L. Regnery, and K. M. Edwards.** 1995. Serologic responses to Bartonella and Afipia antigens in patients with cat scratch disease. *Pediatrics* **96**:1137-42.
238. **Takeda, K., and S. Akira.** 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**:1-14.
239. **Tappero, J. W., J. E. Koehler, T. G. Berger, C. J. Cockerell, T. H. Lee, M. P. Busch, D. P. Stites, J. Mohle-Boetani, A. L. Reingold, and P. E. LeBoit.** 1993. Bacillary angiomatosis and bacillary splenitis in immunocompetent adults. *Ann Intern Med* **118**:363-5.
240. **Tappero, J. W., J. Mohle-Boetani, J. E. Koehler, B. Swaminathan, T. G. Berger, P. E. LeBoit, L. L. Smith, J. D. Wenger, R. W. Pinner, C. A. Kemper, and et al.** 1993. The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis. *Jama* **269**:770-5.
241. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4.
242. **Turner, J., and I. M. Orme.** 2004. The expression of early resistance to an infection with Mycobacterium tuberculosis by old mice is dependent on IFN type II (IFN-gamma) but not IFN type I. *Mech Ageing Dev* **125**:1-9.
243. **Tyeryar, F. J., Jr., E. Weiss, D. B. Millar, F. M. Bozeman, and R. A. Ormsbee.** 1973. DNA base composition of rickettsiae. *Science* **180**:415-7.
244. **Ueno, H., T. Hohdatsu, Y. Muramatsu, H. Koyama, and C. Morita.** 1996. Does coinfection of Bartonella henselae and FIV induce clinical disorders in cats? *Microbiol Immunol* **40**:617-20.
245. **van Pesch, V., H. Lanaya, J. C. Renault, and T. Michiels.** 2004. Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J Virol* **78**:8219-28.
246. **Velho, P. E., A. M. de Moraes, A. M. Uthida-Tanaka, M. L. Cintra, and R. Giglioli.** 2002. Ultrastructural changes in a standard strain of Bartonella henselae after passages through BALB/cAn mice. *Ultrastruct Pathol* **26**:161-9.
247. **Velho, P. S., A. M. Moraes, M. L. Cintra, R. Giglioli, S. A. Goncalves, N. Shlessarenko, and M. E. Camargo.** 1998. Bacillary Angiomatosis: Negative Results Using Normal Balb/c and Balb/c Nude Mice. *Braz J Infect Dis* **2**:300-303.
248. **Vermi, W., F. Facchetti, E. Riboldi, H. Heine, S. Scutera, S. Stornello, D. Ravarino, P. Cappello, M. Giovarelli, R. Badolato, M. Zucca, F. Gentili, M. Chilosi, C. Doglioni, A. Negro Ponzi, S. Sozzani, and T. Musso.** 2005. Role of dendritic cell-derived CXCL13 in the pathogenesis of Bartonella henselae B-rich granuloma. *Blood*.

-
249. **Vermi, W., F. Facchetti, E. Riboldi, H. Heine, S. Scutera, S. Stornello, D. Ravarino, P. Cappello, M. Giovarelli, R. Badolato, M. Zucca, F. Gentili, M. Chilosi, C. Doglioni, A. N. Ponzi, S. Sozzani, and T. Musso.** 2006. Role of dendritic cell-derived CXCL13 in the pathogenesis of *Bartonella henselae* B-rich granuloma. *Blood* **107**:454-62.
250. **Versalovic, J., T. Koeth, and J. R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**:6823-31.
251. **Vogel, S. N., C. T. Hansen, and D. L. Rosenstreich.** 1979. Characterization of a congenitally LPS-resistant, athymic mouse strain. *J Immunol* **122**:619-22.
252. **Wagner, H.** 2004. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* **25**:381-6.
253. **Wear, D. J., A. M. Margileth, T. L. Hadfield, G. W. Fischer, C. J. Schlagel, and F. M. King.** 1983. Cat scratch disease: a bacterial infection. *Science* **221**:1403-5.
254. **Weigent, D. A., T. L. Huff, J. W. Peterson, G. J. Stanton, and S. Baron.** 1986. Role of interferon in streptococcal infection in the mouse. *Microb Pathog* **1**:399-407.
255. **Weisburg, W. G., C. R. Woese, M. E. Dobson, and E. Weiss.** 1985. A common origin of rickettsiae and certain plant pathogens. *Science* **230**:556-8.
256. **Welch, D. F., K. C. Carroll, E. K. Hofmeister, D. H. Persing, D. A. Robison, A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner.** 1999. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice. *J Clin Microbiol* **37**:2598-601.
257. **Welch, D. F., D. A. Pickett, L. N. Slater, A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner.** 1992. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J Clin Microbiol* **30**:275-80.
258. **Weston, S. A., and C. R. Parish.** 1990. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* **133**:87-97.
259. **Woestyn, S., N. Olive, G. Bigaignon, V. Avesani, and M. Delmee.** 2004. Study of genotypes and *virB4* secretion gene of *Bartonella henselae* strains from patients with clinically defined cat scratch disease. *J Clin Microbiol* **42**:1420-7.
260. **Wong, M. T., D. C. Thornton, R. C. Kennedy, and M. J. Dolan.** 1995. A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea* (*Bartonella*) *henselae* from blood and tissue specimens. *J Clin Microbiol* **33**:742-4.
261. **Wynford-Thomas, D., and E. D. Williams.** 1986. Use of bromodeoxyuridine for cell kinetic studies in intact animals. *Cell Tissue Kinet* **19**:179-82.
262. **Xu, Y. H., Z. Y. Lu, and G. M. Ihler.** 1995. Purification of deformin, an extracellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* which causes deformation of erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* **1234**:173-83.

-
263. **Yamamoto, K., B. B. Chomel, R. W. Kasten, C. M. Hew, D. K. Weber, and W. I. Lee.** 2002. Experimental infection of specific pathogen free (SPF) cats with two different strains of bartonella henselae type I: a comparative study. *Vet Res* **33**:669-84.
264. **Yamamoto, K., B. B. Chomel, R. W. Kasten, C. M. Hew, D. K. Weber, W. I. Lee, S. Droz, and J. E. Koehler.** 2002. Experimental infection of domestic cats with Bartonella koehlerae and comparison of protein and DNA profiles with those of other Bartonella species infecting felines. *J Clin Microbiol* **40**:466-74.
265. **Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**:640-3.
266. **Zähringer, U., B. Lindner, Y. A. Knirel, W. M. van den Akker, R. Hiestand, H. Heine, and C. Dehio.** 2004. Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from Bartonella henselae ATCC 49882T. *J Biol Chem* **279**:21046-54.
267. **Zal, T., A. Volkmann, and B. Stockinger.** 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* **180**:2089-99.
268. **Zangwill, K. M., D. H. Hamilton, B. A. Perkins, R. L. Regnery, B. D. Plikaytis, J. L. Hadler, M. L. Cartter, and J. D. Wenger.** 1993. Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. *N Engl J Med* **329**:8-13.
269. **Zawatzky, R., H. Kirchner, J. DeMaeyer-Guignard, and E. DeMaeyer.** 1982. An X-linked locus influences the amount of circulating interferon induced in the mouse by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **63**:325-32.
270. **Zeaiter, Z., P. E. Fournier, and D. Raoult.** 2002. Genomic variation of Bartonella henselae strains detected in lymph nodes of patients with cat scratch disease. *J Clin Microbiol* **40**:1023-30.
271. **Zimmermann, R., V. A. Kempf, E. Schiltz, K. Oberle, and A. Sander.** 2003. Hemin binding, functional expression, and complementation analysis of Pap 31 from Bartonella henselae. *J Bacteriol* **185**:1739-44.

Anhang**Zusammensetzung der Nährmedien zur Anzucht der Bakterien:**

Medium	Substanz	Menge	Bezugsquelle
Hämatin-Agar (pH 7,2)	Difco™ Columbia blood agar base Schafblut (10 min gekocht) Heminlösung 0,025%ig (w/v) Wässriges NAD 0,5%ig (w/v) Voll entsalztes Wasser	396 g 450 ml (5%) 22,5 ml 4,5 ml ad 9000 ml	Fa. BD Biosciences, Heidelberg Fa. Fiebig Nährstofftechnik, Idstein Fa. Serva, Heidelberg Fa. Merck, Darmstadt
Hefe-Cystein- Blut-Agar (HCB-Agar) (pH 7,4)	Bacto Agar NaCl Pepton aus Casein Glucose Hefeextrakt Fleischextrakt KOH 9,09%ig (w/v) Vitamin K1-Lösung (9,84 mg/ml) Heminlösung 0,05%ig (w/v) L-Cysteinlösung 3%ig (w/v) Schafblut Voll entsalztes Wasser	144 g 40 g 80 g 16 g 40 g 16 g 56 ml 0,8 ml 80 ml 80 ml 800 ml (10%) ad 8000 ml	Fa. BD Biosciences, Heidelberg Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt Fa. BD Biosciences, Heidelberg Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt Fa. Sigma, Steinheim Fa. Serva, Heidelberg Fa. Serva, Heidelberg Fa. Fiebig Nährstofftechnik, Idstein
Glycerinhaltiges Medium zum Einfrieren der Bartonellen	Tryptose NaCl Fleischextrakt Hefeextrakt Cystein-hydrochlorid Glucose Na ₂ HPO ₄ Glycerol Aqua dest.	10 g 5 g 3 g 5 g 0,4 g 1 g 4 g 150 ml ad 1000 ml	Fa. Oxoid, Wesel Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt Fa. BD Biosciences, Heidelberg Fa. Serva, Heidelberg Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt
Flüssigmedium für Bartonellen	Difco™ Bacto Trypton Pepton aus Fleisch Hefeextrakt NaCl D-Glucose Fleischextrakt, trocken	12 g 5 g 3 g 5 g 1 g 3 g	Fa. BD Biosciences, Heidelberg Fa. Roth, Karlsruhe Fa. BD Biosciences, Heidelberg Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt

Zusammensetzung der Zellkulturmedien:

Die hierzu verwendeten Materialien wurden von Fa. GIBCO® Invitrogen, Fa. Sigma-Aldrich (2-Mercaptoethanol und Non-essential Amino Acid) bzw. Fa. PAA, Coelbe (Foetales Kälber Serum (FCS)) bezogen.

Verwendung	Grundmedium	Zusätze
Medium zur Generierung von mDC	RPMI 1640 + L-Glutamin	10% (v/v) FCS 1% (v/v) HEPES (1M) 100 U/ml Penicillin-100µg/l Streptomycin 0,05 mM 2-Mercaptoethanol
Medium zur Kultivierung von mDC	RPMI 1640 + L-Glutamin	2,5% (v/v) FCS 1% (v/v) HEPES (1M) 0,05 mM 2-Mercaptoethanol
Differenzierungsmedium für BM-MΦ	DMEM + 4500 mg/l Glucose + L-Glutamin + Pyruvat	10% (v/v) FCS 1% (v/v) Non-essential Amino Acid 5% (v/v) Pferdeserum 0,05 mM 2-Mercaptoethanol
Medium zur Kultivierung von BM-MΦ	DMEM + 4500 mg/l Glucose + L-Glutamin + Pyruvat	10% (v/v) FCS 1% (v/v) Non-essential Amino Acid 0,05 mM 2-Mercaptoethanol
Medium zur Generierung von pDC	RPMI 1640 + L-Glutamin	10% (v/v) FCS 1% (v/v) Non-essential Amino Acid

Verwendung	Grundmedium	Zusätze
		1% (v/v) Natrium-Pyruvat (100 mM) 100 µg/ml Kanamycin 0,05 mM 2-Mercaptoethanol
Medium zur Kultivierung von pDC	RPMI 1640 + L-Glutamin	10% (v/v) FCS 1% (v/v) Non-essential Amino Acid 1% (v/v) Natrium-Pyruvat (100 mM) 0,05 mM 2-Mercaptoethanol
Medium für VSV-Bioassay	RPMI 1640 + L-Glutamin	5% (v/v) FCS 1% (v/v) HEPES (1M) 100 U/ml Penicillin-100 µg/l Streptomycin 0,05 mM 2-Mercaptoethanol

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen:

Puffer / Lösung	Substanz	Menge	Bezugsquelle
PBS	NaCl K ₂ H ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O KCL Aqua dest.	8 g 0,2 g 2,9 g 0,2 g ad 1000 ml	Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt
<i>DNA-Präparation:</i>			
5 M Natriumchlorid-Lösung	NaCl Aqua dest.	29,2 g ad 100 ml	Fa. Merck, Darmstadt
CTAB/NaCl-Lösung (10% CTAB (w/v) in 0,7 M NaCl)	NaCl Aqua dest. CTAB Aqua dest.	4,1 g 80 ml 10 g ad 100 ml	Fa. Merck, Darmstadt Fa. Sigma, Steinheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1)	Phenol Chloroform Isoamylalkohol	25 ml 24 ml 1 ml	Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt Fa. Sigma, Steinheim
Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (24:1)	Chloroform Isoamylalkohol	24 ml 1 ml	Fa. Merck, Darmstadt Fa. Sigma, Steinheim
TE-Puffer	Tris (Trizma Base), pH 8,0 EDTA	10 mM 1 mM	Fa. Sigma, Steinheim Fa. Roth, Karlsruhe
<i>Aufreinigung von Membranproteinen:</i>			
HEPES-NaCl-Puffer (pH 7,6)	HEPES NaCl in Aqua dest.	20 mM 25 mM	Fa. Roth, Karlsruhe Fa. Merck, Darmstadt
Lysis-Puffer (pH 7,6)	HEPES Saccharose in Aqua dest.	20 mM 5% (w/v)	Fa. Roth, Karlsruhe Fa. Roth, Karlsruhe
<i>Agarosegelelektrophorese:</i>			
10× TBE-Puffer (Laufpuffer)	Tris (Trizma Base) Borsäure 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8 Aqua dest.	108 g 55 g 40 ml ad 1 L	Fa. Sigma, Steinheim Fa. Merck, Darmstadt Fa. Roth, Karlsruhe
0,5 M EDTA-Lösung pH 8	EDTA Aqua dest. nach Einstellen des pHs: Aqua dest.	18,621 g 70 ml ad 100 ml	Fa. Roth, Karlsruhe
Agarosegelladungspuffer	Saccharose Bromphenolblau in 0,5× TBE-Puffer	40% (w/v) 0,25% (w/v)	Fa. Roth, Karlsruhe Fa. Sigma, Steinheim
<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:</i>			
10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Ammoniumpersulfat in Aqua bidest.	5 g ad 50 ml	Fa. Merck, Darmstadt

Puffer / Lösung	Substanz	Menge	Bezugsquelle
4× Trenngelpuffer	Tris (Trizma Base), pH 8.8 in Aqua dest.	1,1 M	Fa. Sigma, Steinheim
4× Sammelgelpuffer	Tris (Trizma Base), pH 6.8 EDTA in Aqua dest.	0,5 M 4 mM	Fa. Sigma, Steinheim Fa. Roth, Karlsruhe
10% SDS (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS) Aqua dest.	5 g ad 50 ml	Fa. Merck, Darmstadt
4× Probenpuffer nach Lämmler	Tris (Trizma Base), pH 6.8 SDS Glycerin β-Mercaptoethanol Bromphenolblau	200 mM 12% (w/v) 32% (v/v) 10% (v/v) 0.003% (w/v)	Fa. Sigma, Steinheim Fa. Merck, Darmstadt Fa. Roth, Karlsruhe Fa. Sigma, Steinheim Fa. Sigma, Steinheim
Elektrophoreselaufpuffer	Glycin Tris (Trizma Base) SDS	192 mM 25 mM 0,1% (w/v)	Fa. Roth, Karlsruhe Fa. Sigma, Steinheim Fa. Merck, Darmstadt
<i>Western-Immunoblot:</i>			
Amidoschwarz-Färbelösung	Amidoschwarz Methanol Essigsäure Aqua dest.	1 g 450 ml 100 ml ad 1000 ml	Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt
Amidoschwarz-Entfärbelösung	Methanol Essigsäure Aqua dest.	900 ml 20 ml ad 1000 ml	Fa. Merck, Darmstadt Fa. Merck, Darmstadt
Blottingpuffer	Tris (Trizma Base) Glycin Methanol Aqua dest.	3,0 g 11,25 g 200 ml ad 800 ml	Fa. Sigma, Steinheim Fa. Roth, Karlsruhe Fa. Merck, Darmstadt
10%ige Magermilchlösung (w/v)	Magermilchpulver PBS	10 g ad 100 ml	Fa. DE-VAU-GE, Lüneburg
PBS/Tween 20 (0.05%-ig, (v/v))	Tween 20 PBS	1 ml ad 2000 ml	Fa. Merck, Darmstadt
<i>Durchflusszytometrie:</i>			
FACS-Puffer	FCS PBS	1 ml ad 100 ml	Fa. PAA,
<i>Nachweis von Nitrit:</i>			
Griess-Reagenz vor dem Gebrauch Lösung A und B im Verhältnis 1:1 mischen	<i>Lösung A:</i> Sulfanilamid H ₃ PO ₄ Aqua dest. <i>Lösung B:</i> Naphtyl-ethylendiamindihydrochlorid (NEDD) Aqua dest.	10 g 50 ml ad 1000 ml 1 g ad 1000 ml	Fa. Sigma, Steinheim Fa. Merck, Darmstadt Fa. Sigma, Steinheim
NaNO ₂ – Standardlösung	NaNO ₂ in Aqua dest.	10 mM	Fa. Merck, Darmstadt
<i>ELISA:</i>			
Diethanolaminpuffer	Diethanolamin MgCl ₂ Aqua dest. pH auf 9,8 einstellen mit 10 M HCl Aqua dest.	97 ml 100 mg 800 ml ad 1000 ml	Fa. Merck, Darmstadt Fa. Sigma, Steinheim

Danksagung

Zur Fertigstellung dieser Arbeit trugen zahlreiche Menschen, die mich motiviert und auf vielfältige Weise unterstützt haben, bei. Ihnen allen danke ich. Ohne sie wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich insbesondere für seine Bereitschaft, diese Arbeit als Vertreter des Fachbereichs Veterinärmedizin zu betreuen, sowie für seine stete Unterstützung in allen Fragen, die das externe Anfertigen einer Promotion nach sich zieht.

Frau PD Dr. Anna Sander danke ich für das Überlassen der grundlegenden Fragestellung, für ihr erfolgreiches Bemühen um meine Finanzierung sowie für ihre Betreuung in den ersten Monaten meiner Arbeit in ihrem Labor.

Herrn Prof. Dr. Christian Bogdan danke ich zum einen für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Mittel, die zum Erstellen dieser Arbeit notwendig waren. Ein besonderer Dank aber gilt ihm für seine fortwährende Unterstützung nach dem Weggang von Frau PD Dr. Anna Sander. Dies ermöglichte das Weiterführen meiner Arbeit und förderte ihre Intensivierung. Seine positiven Rückmeldungen und Anregungen beeinflussten die Entwicklung der Arbeit wesentlich.

Großen Dank pflichte ich Karin Oberle. Sie begleitete mich durch die Hochs und Tiefs des Laboralltags und war in ihrer verständigen, humorvollen, aber auch kritisch-konstruktiven Art stets eine Motivationsquelle. Ihr großer Erfahrungs- und Ideenreichtum lösten so manches technische Problem und wann auch immer es nötig wurde, griff sie mir tatkräftig unter die Arme.

Auch allen anderen Mitgliedern der ehemaligen Bartonellen-Arbeitsgruppe danke ich: Dr. Rainer Zimmermann, der mit großer Geduld die Fragen eines Laboranfängers über sich ergehen ließ, und den beiden Christines, die während ihrer Doktorarbeiten frischen Wind ins Labor brachten.

Dr. Ulrike Schleicher danke ich für ihr stets offenes Ohr, für ihre Diskussionsbereitschaft und vor allem für ihre große Hilfe beim Verfassen der Arbeit. Ihr und ihrer Arbeitsgruppe, insbesondere Nicole, Jan, Till, Claudia, Andrea, Rosa, Nadja und Birgit, danke ich für die freundliche Aufnahme in die Gruppe, sowie für ihre Unterstützung u.a. beim Erlernen zahlreicher neuer, immunologischer Methoden und dem Züchten der verschiedenen Mausstämme.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Friedericke von Loewenich und Mathias Hornef danke ich für ihre aufgeschlossene und humorvolle Art gegenüber Besuchern in ihrem Labor sowie für das Überlassen von Mäusen. Friedericke selbst danke ich für die Übernahme der Bestellung von Mäusen, Mathias für sein aufmunterndes Interesse an den Belangen des „Tierdoktors“.

Andreas Diefenbach und seiner Arbeitsgruppe, besonders Cédric, danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit, ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die immer gute, unkomplizierte und nie langweilige Nachbarschaft im dritten Stock.

Barbara, Frank und Eric danke ich für zahlreiche gemeinsam verbrachte Pausen bzw. für angeregte Gespräche.

Ganz besonders Rainer, aber auch Thomas, Theresa, Sonja und Christian danke ich für die sehr gute Pflege und Betreuung meiner Mäuse sowie die entspannte Atmosphäre im Tierstall.

Den Mitarbeitern der Nährbodenküche, die wegen mir tausende von Agarplatten zusätzlich gossen, danke ich vielmals. Ebenfalls danke ich den Mitarbeitern der Spülküche und des zentralen Bereichs für ihre Hilfsbereitschaft, Jürgen Brandel für seine hervorragenden Photographien sowie Frau Schicke für die Organisation zahlreicher formaler Angelegenheiten.

Allen Mitarbeitern der Diagnostik danke ich für ihre Hilfe bei Tätigkeiten in ihren Laboren; besonders danke ich Herrn Pelz und Annerose Serr für die Charakterisierung von Bakterienstämmen sowie Henriette für das Überlassen von Materialien für den IFT.

Herrn Prof. Dr. Peter Staeheli danke ich für das Überlassen von Mäusen. Ihm und allen weiteren Mitarbeitern der Abteilung Virologie danke ich für die freundliche Nachbarschaft.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Immunologie, allen voran Herrn Prof. Dr. Hanspeter Pircher selbst sowie Dr. Peter Aichele, danke ich für die Gastfreundschaft in ihrem Mausstall, für das entgegengebrachte Vertrauen, ihre Aufgeschlossenheit und große Hilfsbereitschaft.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für die moralische Unterstützung meiner Arbeit. Den größten Anteil nahm sicherlich Holger; „Grüße, Dank, Respekt und Rosenblüten vor die Füße gestreut“ gehen an ihn.

Der Grimminger-Stiftung für Zoonoseforschung danke ich für das großzügige Stipendium.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5101-7



9 783835 951013

