

Aus dem Institut
für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
der Universitätsmedizin Rostock
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski

**Untersuchungen zur proinflammatorischen Reaktion
von Makrophagen bei Infektion mit *Bartonella henselae***

Inaugraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Dhani Schuster
aus Rostock
geboren am 13.07.1979 in Göttingen

Rostock, 2014

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Volker Kiefel,

Institut für Transfusionsmedizin, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Johannes Knobloch

Zentralinstitut für Krankenhaushygiene, Paracelsus-Klinik Osnabrück

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Mardjan Arvand

Abteilung für Infektionskrankheiten, Fachgebiet 14 - Angewandte
Infektions- und Krankenhaushygiene, Robert Koch Institut Berlin

Datum der Einreichung: 27.Juni 2014

Datum der Verteidigung: 20. Oktober 2015

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	3
2	Abkürzungsverzeichnis	6
3	Einleitung	7
3.1	Die Gattung <i>Bartonella</i>	7
3.1.1	Taxonomie und Geschichte	7
3.1.2	Mikrobiologische Charakteristika	9
3.1.3	Pathogenese.....	10
3.1.4	Klinisches Spektrum von <i>Bartonella henselae</i> Infektionen	12
3.1.4.1	Katzenkratzkrankheit (KKK)	12
3.1.4.2	Vaskuloproliferative Erkrankungen.....	14
3.1.4.3	Weitere Manifestationen.....	16
3.1.5	Epidemiologie	16
3.1.6	Diagnostik.....	17
3.1.6.1	Serologische Nachweismethoden	17
3.1.6.2	Kulturelle Nachweisverfahren.....	18
3.1.6.3	Molekularbiologische Nachweismethoden	18
3.1.6.4	Histopathologie	18
3.1.7	Therapie	19
3.2	Makrophagen	20
3.2.1	THP-1 Monozyten.....	23
3.3	Zytokine.....	23
3.3.1	Das Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	24
3.4	Zielsetzung dieser Arbeit	26
4	Material	27
4.1	Geräte	27

4.2	Verbrauchsmaterialien.....	27
4.3	Sonstige Medien	28
4.4	Kulturmedien	28
5	Methoden	29
5.1	Aufbereitung für die Erhaltung der Bakterien bei -80°C	29
5.2	Bestimmung der Keimzahl der Bakterien durch erstellen einer seriellen Verdünnungsreihe.....	29
5.3	Bakterienanzucht für in vitro Infektionen	30
5.4	Herstellung von hitzegetöteten Bakterien.....	31
5.5	Kultivierung der Zelllinie THP-1 und Vorbereitung für den Infektionsversuch	31
5.6	Vorbereitung der Bakterien für Infektionsversuche.....	32
5.7	Ablauf der Infektion von Makrophagen mit <i>B. henselae</i>	33
5.8	Gewinnung von Überständen.....	35
5.8.1	Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) der Überstände ..	35
5.9	Isolierung von primären humanen Makrophagen durch das Magnetic Labeled Bead Cell Separation Verfahren	37
5.10	Einfärben der Zellen für Doppelimmunfluoreszenz (DIF)	41
5.10.1	Quantitative Auswertung des Infektionsgrades mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie	43
5.11	Durchführung der Elektronenmikroskopie von infizierten und nicht infizierten Makrophagen.....	44
5.12	Statistik	44
6	Ergebnisse	45
6.1	Adhärenz, Internalisierung und Persistenz von <i>Bartonella</i> B1-SK1 und B1-SK50 in THP-1 Zellen	45
6.2	Die Infektion von THP-1 Makrophagen und primären humanen Makrophagen mit <i>Bartonella henselae</i> induziert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen.	46

6.2.1	Vergleich der Ausschüttung von TNF- α durch THP-1 Makrophagen bei Infektion mit verschiedenen Passagen von <i>B. henselae</i>	46
6.2.2	Vergleich der Ausschüttung von TNF- α durch THP-1 Makrophagen bei Infektion mit vitalen und hitzeinaktivierten <i>B. henselae</i>	47
6.2.3	Vergleich der Ausschüttung von TNF- α durch primäre humane Makrophagen bei Infektion mit <i>B. henselae</i> in verschiedener Quantität	48
6.3	Doppelimmunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von gebundenen und intrazellulären <i>B. henselae</i> in THP-1 Zellen und primären humanen Makrophagen	49
6.3.1	Mikroskopische Bestimmung des Infektionsgrades der primären humanen Makrophagen nach Infektion mit <i>B. henselae</i> in unterschiedlicher Bakterienanzahl pro Zelle.	50
6.4	Elektronenmikroskopische Darstellung der gebundenen und intrazellulären <i>B. henselae</i> in primären humanen Makrophagen	51
6.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	53
7	Diskussion	54
7.1	Die Infektion von THP-1 Makrophagen und primären humanen Makrophagen mit <i>B. henselae</i> induziert die Produktion von TNF- α	54
7.2	Internalisierung und Persistenz von <i>Bartonella</i> B1-SK1 und B1-SK50 in THP-1 Zellen	59
7.3	Zusammenfassung	62
7.4	Ausblick	63
8	Danksagung	65
9	Erklärung	66
10	Literatur	67

2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	IFN	Interferon
°C	Grad Celsius	IgG	Immunglobulin G
µg	Mikrogramm	IgM	Immunglobulin M
µl	microliter	IL	Interleukin
AFIP	Armed Forces Institute of Pathology	JNK	c-Jun N-terminale Kinase
AK	Antikörper	KBE	Koloniebildende Einheit
ATCC	engl.: American type culture collection (Amerikanische Kulturkollektion)	kDa	kilo Dalton
B1-SK1	Bartonella henselae 1-mal subkultiviert	KKK	Katzenkratzkrankheit
B1-SK50	Bartonella henselae 50-mal subkultiviert	LPS	Lipopolysaccharid
BA	Baciläre Angiomatose	M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
BSA	bovines serum albumin	MHC	Major Histocompatibility Complex
ca.	circa	min	Minute
CBA	cytometric bead array	ml	milliliter
CO ₂	Kohlendioxid	MAPK	Molarität/Liter
DIF	Doppelimmunfluoreszenz	MPS	p38-Mitogen aktivierte Proteinkinase
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)	M _r	mononuklear phagozytierendes System
ELISA	engl.: enzyme-linked immunosorbent Assay (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)	ng	Molekülmasse
		nm	Nanogramm
		PBS	nanometer
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase	PBS	Phorbolester
EM	Elektronenmikroskopie	PCR	phosphatbuffer salzig
et al	lat.: et alii (und andere)		engl.: polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting (fluoreszenz aktivierte Zellsortierung)	pg	Pikogramm
FBS	engl.: fetal bovine serum (fetales Kälberserum)	PH	Peliosis Hepatis
fMLP	formyl-Methionyl Leucyl-Phenylalanin	PHM	primärer humaner Makrophage
g	Erdbeschleunigung	RES	Retikuloendotheliaes System
GM-CSF	engl.: granulocyte macrophage colony stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierender-Faktor)	RNA	engl.: ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
h	Stunde	rpm	engl.: revolution per minute (Umdrehungen pro Minute)
HIV	engl.: human immunodeficiency virus (humane immunodefizienz Virus)	rRNA	ribosomale RNA
		Spp	Subspezies
		TACE	engl.: tumor necrosis factor converting enzyme
		TGF	engl.: transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
		TNF	Tumornekrosefaktor
		z. B.	zum Beispiel
		ZNS	Zentrales Nervensystem

3 Einleitung

3.1 Die Gattung *Bartonella*

3.1.1 Taxonomie und Geschichte

Die Bakterien der Gattung *Bartonella* umfassen insgesamt 24 verschiedene Spezies, von denen neun als humanpathogen angesehen werden, nämlich *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. clarridgeiae*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* und *B. washoensis* [1-10].

Lange Zeit war *B. bacilliformis* das einzige bekannte Bakterium der Gattung *Bartonella*. Als Namensgeber gilt der peruanischen Arzt Alberto Barton, welcher das Bakterium 1909 als Erreger der in den Anden Perus, Ecuadors und Kolumbien endemisch auftretenden Carrion'schen Krankheit erstmals beschrieb [2]. Diese zeigt sich als eine in zwei Schüben verlaufende Erkrankung mit hoher Letalität, bei der es nach einer Inkubationszeit von zwei bis sechs Wochen zu einer hämolytischen Anämie mit gleichzeitig auftretendem hohen intermittierenden Fieber kommt. Verläuft die Erkrankung nicht letal, treten oftmals Wochen bis Monate nach der akuten Phase noduloverruköse teleangiektatische Granulome an Gesicht und Extremitäten auf [3].

Der zweite humanpathogene Vertreter *B. quintana* wurde als Erreger des Fünf-Tage-Fiebers insbesondere während der beiden Weltkriege bekannt, wo es viele Epidemien auslöste. Die Erkrankung wird deshalb auch Schützengrabenfieber (Trench Fever) genannt [4]. Vermehrt zeigte sich eine Infektion mit *B. quintana* seit Anfang der 1980er Jahre sowohl bei Erkrankungen von Obdachlosen und Drogenabhängigen (Urban Trench Fever) als auch als Erreger von vasoproliferativen Veränderungen bei HIV-positiven Patienten (Bazilläre Angiomatose (BA)). Zudem konnte das Bakterium als Auslöser von Endokarditiden identifiziert werden. Chronisch infizierte und chronisch

bakteriämische Menschen können jedoch auch völlig symptom- und fieberfrei sein [5]. Der Name des Bakteriums änderte sich im Laufe der Zeit von *Rickettsia quintana*, über *Rochalimaea quintana*, bis zwischen 1993 und 1995 eine Reklassifizierung aufgrund der DNA-Hybridisierung und 16S rRNA-Sequenzierungsergebnisse erfolgte, infolgedessen die Gattung der *Rochalimaea* und die Gattung der *Grahamella*, der Familie der *Bartonellaceae* zugeordnet wurde [6] [7].

B. henselae wurde 1990 das erste Mal aus dem Blut eines HIV-infizierten Patienten isoliert und in der Folge als Ursache seiner Bakteriämie und seines Fiebers interpretiert [8]. 1992 wurde es genau charakterisiert und zunächst als *Rochalimaea henselae* nach der medizinisch-technischen Assistentin Diane Hensel bezeichnet [9], um 1993 im Rahmen der oben genannten Reklassifizierung seinen heutigen Namen *Bartonella henselae* zu erhalten. Innerhalb der *B. henselae* Isolaten werden heute bezüglich der 16S rRNA zwei Genotypen [10] und aufgrund molekularbiologischer Untersuchungen mehrere Varianten unterschieden [11-14]. Auch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, dass in einem *B. henselae* Isolat zwei verschiedene 16S rRNA gefunden werden können [15].

Der spezifischer Hauptwirt und das Reservoir für *B. henselae* ist die Hauskatze [16]. Es gilt jedoch inzwischen als sicher, dass alle Säugetiere von *B. henselae* infiziert werden können, so konnten inzwischen Isolate aus Hunden [17], Affen [18] und Waldmäusen [19] gewonnen und die *Bartonella*-DNA in Blutproben von zwei Schweinswalen gefunden werden [20-21]. Infizierte Hauskatzen entwickeln eine mehrere Monate anhaltende Bakteriämie, während dieser die Bakterien auf andere Katzen oder Menschen durch Kratz- oder Beißverletzungen übertragen werden können [15] [22]. Die Übertragung auf den Wirt erfolgt durch direkten Kontakt oder blutsaugende Arthropoden, wie den blutsaugenden Katzenfloh (*Ctenocephalides felis*) [23-25] und dessen Kot, in dem *B. henselae* mehrere Tage überlebensfähig ist [26] [23] oder durch Zecken (*Ixodes ricinus*) [27-29]. Außerdem konnte *B. henselae*-DNA aus dem Wadenstecher (*Stomoxys spp.*) isoliert werden [30].

Die Erkrankungen durch weitere humanpathogene *Bartonella* Arten sind sehr vielfältig. *B. elizabethae* und *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* gelten hauptsächlich als mögliche Erreger einer Endokarditis, nachdem sie aus dem Blut eines Patienten mit Endokarditis isoliert wurden [31] [32]. *B. grahamii* kann Uveitis verursachen [33], *B. clarridgeiae* wurde auch bei einem Patienten mit Katzenkratzkrankheit (KKK) [34], *B. vinsonii* subsp. *arupensis* bei einem Patienten mit Valvulopathie und Fieber gefunden [35]. *B. washoensis* konnte als mögliche Ursache von Myokarditiden identifiziert werden [36] [37].

3.1.2 Mikrobiologische Charakteristika

Bakterien der Gattung *Bartonella* sind pleiomorphe, anspruchsvolle, gramnegative, aerobe und Oxidase-negative Stäbchen. Sie leben fakultativ intrazellulär, d.h. sie sind sowohl intra- als auch extrazellulär vermehrungsfähig. Ihre Länge beträgt etwa 2 µm und ihre Breite 0,5 – 0,6 µm [9]. Taxonomisch werden sie der Familie Bartonelaceae, der Ordnung Rhizobiales und der Klasse der α_2 -Proteobakterien zugeordnet. Sie sind evolutionär nahe verwandt mit den Genera *Brucella*, *Agrobakterium* und *Rhizobium*. Sie wachsen auf unbelebten Nährmedien nur langsam. In vitro ist *B. henselae* in Zellkultur, auf Kochblut- oder mit Hämin angereichertem Agar bei 37°C, erhöhter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultivierbar [38]. Bei Erstisolation und Kultivierung auf Kochblutagar sind bis zum Auftreten von sichtbaren Kolonien Inkubationszeiten von zwei bis fünf Wochen nötig. Diese Zeitspanne lässt sich durch weiteres Passagieren der Bakterien verkürzen. *B. henselae* Motilität besitzt die Fähigkeit der Pilusexpression. Phänotypisch entsprechen die exprimierten Pili dem Typ IV Pilus, welcher Bestandteil aller Gram-negativer Bakterienoberflächen ist und eine große Rolle bei der Wirtserkennung und Invasion von pathogenen Bakterien, bei der Motilität auf Oberflächen (engl. twitching motility) sowie beim DNA-Transfer besitzt. Die Fähigkeit der Expression der Pili verlieren die Bakterien jedoch häufig nach mehreren Passagen wieder [39].

3.1.3 Pathogenese

Bartonellen sind Pathogene, die wie viele Bakterien auf bestimmte Wirte beschränkt sind. Eine lang anhaltende, intraerythrozytäre Bakterämie als Kennzeichen einer erythrozytären Infektion findet ausschließlich in wenigen Wirtstieren, wie beispielsweise der Hauskatze, statt. Endotheliale Zellen hingegen scheinen der primäre Zielzelltyp für bakterielle Kolonisationen sowohl im Hauptwirt als auch bei Fehl- bzw. Zufallswirten zu sein [40]. Nach Übertragung auf den Hauptwirt beginnt der Infektionszyklus durch Besiedelung der sogenannten Primärnische, welche hauptsächlich aus Endothelzellen besteht, aber auch Zellen des retikuloendothelialen Systems umfassen kann. Die Bakterien adhärieren an die Endothelzellen und invadieren über einen aktin-abhängigen Prozess [41]. Nach der Invasion replizieren Bartonellen in diesen Endothelzellen. Dies konnte mikroskopisch und durch Quantifizierung der intrazellulären Bakterien direkt sowie über die Zunahme der ribosomalen RNA indirekt nachgewiesen werden [42-44]. Neben dem aktin-abhängigen Prozess wurde ein weiterer spezifischer Wirtszell-Pathogen Mechanismus beschrieben. Hier wird die Internalisierung der zuvor an der Zelloberfläche akkumulierten Bakterien, durch eine solitäre sich distal vom Zell-Nukleus befindende, globuläre Struktur mit einem Durchmesser von 5 - 15µm, ermöglicht. Diese Struktur wird als Invasom bezeichnet und der gesamte Vorgang dauert ca. 24 h [41].

Ungefähr am Tag fünf der Infektion, werden die Bakterien aus der Primärnische in das Blut freigesetzt, wo sie Erythrozyten infizieren und zusätzlich die Zellen der Primärnische neu besiedeln. Dadurch kommt es zu einem andauernden Infektionszyklus in ungefähr 5-tägigen Abständen, welcher erst durch eine Antikörper-abhängige Immunantwort durchbrochen werden kann [45] [46]. Internalisiert verweilt das Bakterium intrazellulär bis zum Ableben des Erythrozyten, woraus die langandauernde intraerythrozytäre Infektion entsteht, die typischerweise zu beobachten ist [45]. Bei humanen Infektionen durch *Bartonella spp.* ist die Primärnische bisher unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass *B. henselae* weder an humane Erythrozyten adhäriert, noch in sie invadiert. Jedoch adhäriert und invadiert das Bakterium in hämatopoetische

Progenitorzellen (HPC) und war in diesen Zellen intrazellulär bis zum Tag 13 nach Infektion noch detektierbar. Aufgrund dieser Tatsachen wird vermutet, dass HPCs die Primärnische bei humanen *Bartonella spp.* Infektionen darstellt [47].

Bartonellen können eine Vielzahl von Erkrankungen hervorrufen, abhängig sowohl von der beteiligten Bartonellaspezies (siehe oben) als auch vom Immunstatus des Patienten. Es konnte in vielen Fallstudien gezeigt werden, dass Erkrankungen zwar bei Immunkompetenten auftreten können [28], die schwersten Ausprägungen der Erkrankungen aber bei geschwächter zellulärer Immunabwehr, durch beispielsweise eine HIV-Infektion, auftreten [48-51] [9] [8].

Über die einzelnen Pathogenitätsstrategien und die Interaktionen zwischen dem Bakterium und dem menschlichen Organismus ist verhältnismäßig wenig bekannt. Die bisher hauptsächlich erforschten Pathogenitätsstrategien von *B. henselae*, welche sich klinisch u. a. im Rahmen von vaskuloproliferativen Erkrankungen zeigen, sind die direkte Stimulation der Endothelzellproliferation [52] [53], die Aktivierung des Hypoxie-induzierenden Faktors 1 (HIF-1) [54], die Auslösung einer proangiogenetischen Wirtszellantwort [55] [56] mit der daraus folgenden pathologischen Angiogenese, die Inhibition der Endothelzellapoptose [57] [58], die Zersetzung der Wirtszelle durch das VirB Typ IV Sekretionssystem (Typ4-SS) [59], die Benutzung von afimbriellen Adhäsinen (BadA) [60] und die Kommunikation über Proteine in der äußeren Bakterienmembran (OMP) [61]. In der Gesamtheit helfen sie dem Bakterium die Zielzellen des Wirtes zu infizieren und in ihnen zu persistieren.

Es konnte gezeigt werden, dass durch vermehrtes Passagieren eines Bakterienstammes von *B. henselae* oder *B. quintana*, sich nicht nur die Morphologie der Bakterienoberfläche [62] und die der einzelnen Bakterienkolonien verändert [63] [9], sondern auch, dass die Bakterien die Fähigkeit verlieren, einzelne oder mehrere der obengenannten Angriffsstrategien anzuwenden [39] [64].

Als mögliche Abwehrreaktionen des infizierten Organismus konnte im Rahmen

von in vitro Untersuchungen gezeigt werden, dass *B. henselae* die Phagozytose stimuliert, die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (oxidativer burst) in polymorphkernigen Leukozyten aktiviert und sowohl den alternativen C3-vermittelten Weg des Komplementsystems, mit nachfolgender Zytolyse des Erregers, als auch den klassischen Weg ohne einen spezifischen Antikörper aktivieren kann [65]. Um eine parenchymatöse und systemische Ausbreitung der Bakterien zu verhindern, bildet der Körper Granulome durch Kooperation von Makrophagen, T-Zellen und Neutrophilen [66] [67]. Die Interaktion zwischen den Makrophagen und Bakterien führt zu einer Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren mit autokrinen und parakrinen Funktionen, die auch der Regulation der Angiogenese dienen [68] [69].

Der direkte Zusammenhang von *Bartonella spp.* mit vaskuloproliferativen Erkrankungen, welche sich dadurch auszeichnen, dass lobuläre Kapillarproliferationen von Neutrophilen, T-Zellen und Makrophagen durchsetzt sind [51] [50], gilt deshalb als bewiesen, weil das Bakterium hier sowohl mikroskopisch in enger Assoziation zum proliferierenden Endothel gefunden werden konnte [1], als auch kulturell und mit molekularbiologischen Methoden in den Gefäßproliferationen detektiert wurde [70] [71].

3.1.4 Klinisches Spektrum von *Bartonella henselae* Infektionen

3.1.4.1 Katzenkratzkrankheit (KKK)

Die KKK ist eine gutartige, selbstlimitierende Erkrankung, welche ohne antibiotische Therapie in der Regel 6 - 12 Wochen andauert. Sie ist bis auf wenige Ausnahmen Folge der Infektion eines immunkompetenten Menschen mit *B. henselae* [72]. In 50 – 75% der Fälle bildet sich an der Stelle der Hautläsion (klassischerweise Katzenkratzer/-biss) eine Papel oder Pustel aus, worauf dann nach 7 – 50 Tagen im Abflussgebiet der Primärläsion eine regionäre Lymphadenopathie folgt, die in der Hälfte aller Fälle dann auch als einziges Symptom bestehen bleibt. Die betroffenen Lymphknoten erreichen ungefähr zwei bis drei Wochen nach Beginn der Symptomatik ihre maximale Größe von ein bis fünf Zentimetern, teilweise aber auch bis zu zwölf

Zentimetern. Die Ausprägung der Schwellung untersteht einer großen interindividuellen Variabilität. Typischerweise nimmt sie innerhalb der folgenden Wochen bis Monate langsam wieder ab. In rund zehn Prozent der Fälle kommt es zu einer eitrigen Einschmelzung des Lymphknotens [1] [73] [74].

Achtzig Prozent der befallenen Lymphknoten befinden sich an den oberen Extremitäten, Kopf oder Nacken [75] [76]. Fünfzig Prozent der Patienten klagen zusätzlich über leichtes Unwohlsein, Kopfschmerzen oder Fieber. Des Weiteren können sich Übelkeit, Gewichtsabnahme, Halsschmerzen und Splenomegalie ausbilden [1] [77]. Zu atypischen Manifestationen kommt es in zehn Prozent der Fälle. Sie können sehr vielfältig sein und reichen von dem am häufigsten auftretenden Parinaud'schen okuloglandulären Syndrom, einer einseitigen, subakuten Konjunktivitis mit begleitender präaurikulärer Lymphadenopathie, bis zu Enzephalitis, zerebraler Arteriitis, Radikulitis, Myelitis, granulomatöser Hepatitis oder Splenitis, atypischer Pneumonie, hilärer Adenopathie, Pleuraerguß, Osteomyelitis, Erythema nodosum, Erythema anulare und Parotisschwellung [78-81].

Histologisch sieht man in den befallenen Lymphknoten eine nekrotisierende granulomatöse Entzündungsreaktion mit lymphozytären Infiltraten und mehrkernigen Riesenzellen. Zu einer Abszedierung der befallenen Region kommt es in 15 % der Fälle [75].

Lange Zeit war der Erreger der KKK unbekannt. Die Krankheit wurde zwar schon 1950 ausführlich beschrieben [82], die Diagnose konnte lange aber ausschließlich klinisch gestellt werden, wenn mindestens drei der folgenden vier Kriterien positiv waren [83]:

1. Kontakt mit einer Katze und Nachweis eines Kratzers bzw. einer Primärläsion von Haut, Auge oder muköser Membran.
2. Eine positive Reaktion beim Hauttest nach Hangar und Rose.
3. Laborchemischer Ausschluss anderer Ursachen einer Lymphadenopathie.

4. Charakteristischer histopathologischer Befund in Biopsien von betroffenen Lymphknoten oder anderen Orten des befallenen Systems.

Erst 1988 konnte im Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) aus dem Lymphknoten eines an KKK erkrankten Patienten ein Bakterium gewonnen werden. Dieses Bakterium wurde dann 1991 nach dem Ort der Erstisolation und nach dem angenommenen Infektionsüberträger, einer Katze (lat. *felis*), als *Afipia felis* bezeichnet und von nun an für den Erreger der KKK gehalten [9]. Die folgenden Untersuchungen lieferten jedoch keine zusätzlichen Beweise für diese Ätiologie der KKK, so dass *Afipia felis* heute nur noch eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung der KKK beigemessen wird [84]. Schon 1992 wurde dann *Rochalimaea henselae* als Erreger vermutet, weil gezeigt werden konnte, dass 88% der an KKK-Erkrankten erhöhte Antikörpertiter gegen *Rochalimaea henselae* aufwiesen, jedoch nur 3 % der Gesunden [85]. Endgültig als Erreger identifiziert wurde *Rochalimaea henselae* im Jahr 1993, als man ihn direkt aus einem befallenen Lymphknoten isolieren und kultivieren konnte, und ihn mittels Gesamtzellfettanalyse und PCR sicher identifizierte [77].

3.1.4.2 Vaskuloproliferative Erkrankungen

Sowohl die Bazilliäre Angiomatose (BA), welche 1989 durch LeBoit ihren Namen erhielt [51], als auch ihre viszeralen Manifestation, zum Beispiel der Befall der Leber (Peliosis hepatis (PH)) oder anderer innerer Organe, zählen zu den vaskuloproliferativen Krankheiten und sind generalisierte Manifestationen der systemischen Infektion [86] [87]. An ihnen erkranken vorrangig immunsupprimierte Patienten, besonders HIV-Infizierte. Es können jedoch genauso immunkompetente Patienten an ihnen erkranken [86] [88] [89]. Als Verursacher der Erkrankungen gelten *B. henselae* und *B. quintana* [90].

Morphologisch zeigt sich die BA, wie in der Abbildung 1B dargestellt, als einzelne oder multipel auftretende, kutane oder subkutane Läsionen, welche meist ein derbes rötlich-livides Aussehen haben [91].

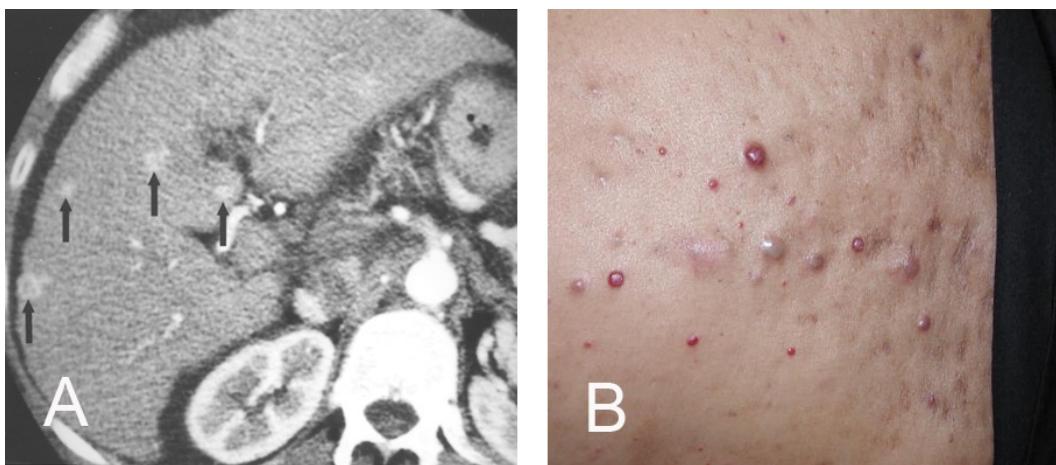


Abbildung 1: Computertomographisches-Aufnahme und Lichtbild eines Patienten mit BA und/oder PH:

A: Kontrastmittelverstärktes helikales Abdomen-CT eines 65 Jahre alten Patienten mit primärer biliärer Zirrhose und PH. Man erkennt homogene Kontrastmittelverstärkungen während der hepatischen arteriellen Phase. [92]

B: Erkennbar sind die für eine BA typischen kleinen Kirsch-Angiome ähnlichen kutanen Läsionen und Knötchen am Rumpf eines Patienten. [93]

Die PH zeigt, wie in Abbildung 1A zu sehen, morphologisch dilatierte Lebersinusoiden und zystisch-gekammerte, blutgefäßfüllte Endothelzell-Proliferationen, umgeben von myxoidem Stroma.

Histologisch darstellbar sind bei allen Formen lobuläre kapilläre Gefäßproliferationen, die von Neutrophilen, T-Zellen und Makrophagen durchsetzt sind [51] [50], sowie epitheloide teilweise atypischer Endothelzellen, die Blutgefäße auskleiden und teilweise in das Lumen hineinragen [91].

Die Läsionen werden typischerweise von aktivierten Monozyten und Makrophagen infiltriert [51] [94]. Die BA zeigt sich durch drei klinische Bilder, die einzeln, aber auch zusammen auftreten können [95]:

1. Hautläsionen (50%)
2. Abdominelle Symptome (20% als einzige klinische Ausprägung)
3. Fieber und Lymphadenopathie (20% als einzige klinische Ausprägung)

Die Patienten mit PH beklagen Fieber, Abdominalschmerzen, Gewichtsverlust und Hepatomegalie [96].

3.1.4.3 Weitere Manifestationen

Bei Patienten mit geschwächter Abwehrlage, insbesondere bei HIV-infizierten Patienten, können Endokarditis, Osteomyelitis, rezidivierende Bakterämien mit systemischen Manifestationen bestimmter Organe, beispielsweise der Lunge sowie selten ein Befall des zentralen Nervensystems mit Enzephalitis auftreten [97] [1] [98] [86] [50].

3.1.5 Epidemiologie

In Europa ist die Katzenkratzkrankheit das am häufigsten durch Bakterien der Gattung *Bartonella* verursachte Krankheitsbild und im Kindes- und Jugendalter eine häufige Ursache einer benignen chronischen Lymphadenopathie. Die KKK kann in jedem Lebensalter auftreten, jedoch sind 80% aller Erkrankten Kinder zwischen 2 und 14 Jahren, von denen 90% vor der Erkrankung einen Kontakt zu Katzen angaben. Patienten mit BA hatten hingegen nur zu 20% im Vorfeld Kontakt zu Katzen [99] [100].

Die in Prävalenzstudien gewonnenen und veröffentlichten Zahlen über den Prozentsatz der Menschen, bei denen *Bartonella*-spezifische Antikörper nachweisbar waren, reichen in Europa von 6 – 30% und in den USA bis zu 50% [101] [102]. Die Seroprävalenz von IgG-Antikörpern gegen *Bartonella* steigt mit fortschreitendem Alter, so wurden bei Kindern bisher selten Titer über 1:128 gefunden, bei Erwachsenen hingegen schon [103] [104]. Eine Erkrankung an KKK ist das ganze Jahr über möglich, eine saisonale Häufung ist jedoch von Oktober bis März zu erkennen [100]. Von den 24000 geschätzten Fällen die jährlich in den USA an KKK erkranken, müssen 2000 ins Krankenhaus aufgenommen werden [72] [99].

Das Vorkommen von *Bartonella* spp. bei Katzen ist weltweit noch nicht hinreichend untersucht. Die Seroprävalenz von Hauskatzen im Großraum San Francisco wird mit ca. 41% angegeben [105] wohingegen nur 13% der Katzen im Raum Freiburg seropositiv sind [106] [107]. In Nordamerika wird eine Seroprävalenz von 81% angegeben, wobei nur bei 39,4% eine Erregerisolation

gelang [24]. Bei einer Untersuchung von 713 Katzenseren in Nord- und Süddeutschland konnte festgestellt werden, dass 6 - 15% der untersuchten Katzen seropositiv waren. Zusätzlich wurden klimatische Einflüsse auf die Epidemiologie vermutet, da eine leicht erhöhte Seroprävalenz in Norddeutschland festgestellt wurde [108]. Diese Faktoren können durch klimatische Einflüsse auf die die Krankheit übertragenden Arthropoden entstehen. Die Prävalenz von Katzenflöhen zeigt im Norden Amerikas eine eindeutig positive Korrelation mit feuchtem und warmen Klima [109]. Solcherlei Einflüsse sind beispielsweise schon bei der durch Zecken übertragenen Borreliose bekannt.

3.1.6 Diagnostik

3.1.6.1 Serologische Nachweismethoden

Die Serologie stellt momentan die Standardmethode zum Nachweis der KKK dar. Mittels ELISA, Westernblot, oder indirektem Immunfluoreszenz können Antikörper gegen *B. henselae* nachgewiesen werden. Es können hiermit Ergebnisse mit einer Sensitivität von 98 bis 100 Prozent und einer Spezifität von 60 bis 98 Prozent gewonnen werden [99] [110-113] [85]. Nach der Infektion steigt der IgM-AK Titer bis zu einem Maximum nach rund vier Wochen an und fällt dann langsam wieder unter die Nachweisgrenze. Ein bis zwei Wochen nach Beginn der Erkrankung tritt ein messbarer IgG-AK Titer auf und erreicht seinen Maximalwert nach ungefähr sieben bis acht Wochen, um dann interindividuell sehr variabel zu persistieren oder langsam wieder zu sinken. Ein vierfacher IgG-AK Titeranstieg, ein IgG-AK Titer über 1:512 oder eine Serokonversion gelten als diagnoseweisend [114]. In Europa konnte eine relativ hohe Durchseuchung nachgewiesen werden, so wurde bei Schweizer Blutspendern je nach städtischer oder ländlicher Herkunft bei 26 bis 60% [115], bei deutschen gesunden Erwachsenen unabhängig von aktueller Katzenexposition rund 30% Antikörper gegen *B. henselae* gefunden. In den USA hingegen konnten nur bei 4 – 6% der negativen Kontrollkollektive Antikörper nachgewiesen werden[116] [117]. Der Antikörernachweis im Serum ist ebenso auch bei durch *B. henselae* verursachter Endokarditis sowie Peliosis hepatis möglich.

3.1.6.2 Kulturelle Nachweisverfahren

Es ist prinzipiell möglich, aus Abstrichen, Lymphknoten oder in Blutkulturen Bartonellen anzuzüchten. Dies wäre erstrebenswert, durch das langsame Wachstum der Erreger ist es jedoch sehr zeitaufwändig und für die routinemäßige Diagnostik zu unzuverlässig. Zudem gelingt es nur selten. Als höchste Anzuchtrate werden 20,5 % positive Kulturen genannt [118].

3.1.6.3 Molekularbiologische Nachweismethoden

Durch Feinnadelbiopsien aus betroffenem Gewebe kann mittels PCR mit anschließender Hybridisierung und 16S rRNA-Sequenzierung der DNA-Nachweis des Bakteriums erbracht werden [119] [120]. Tiefgefrorenes oder frisch gewonnenes Material (Biopsien, Aspirate, Abstriche) ist für diese Untersuchung sehr gut geeignet, bei formalinfixiertem Gewebe hingegen können falsch negative Ergebnisse auftreten. Die PCR ist dabei wesentlich sensitiver als die Kultur, jedoch zum jetzigen Zeitpunkt in deutlich weniger Laboratorien verfügbar. Bei systemischen Symptomen kann ein DNA-Nachweis auch aus peripherem Blut versucht werden [121].

3.1.6.4 Histologie

Prinzipiell ist die histologische Untersuchung einer Gewebeprobe und der mikroskopische Nachweis des Erregers sowohl bei der BA als bei der durch *B. henselae* verursachten Endokarditis und der Peliosis hepatis möglich.

Speziell bei der KKK können histologisch drei Entwicklungsstadien unterschieden werden:

Stadium 1: Hyperplasie der Keimzentren sowie epitheloidzellige Granulome mit häufigem Nachweis von Langhans'schen Riesenzellen.

Stadium 2: Die Zahl der Granulome nimmt zu, es kommt zu Fusionen untereinander. Zudem werden die fusionierten Granulome von polymorphkernigen Leukozyten infiltriert. Es bilden sich zentrale Nekrosen mit progressiver Einschmelzung [122].

Stadium 3: Hier finden sich eine Vielzahl von eitergefüllten Sinus. Durch eine Kapselruptur kann sich Eiter in das umliegende Gewebe entleeren [123].

Zusätzliche Hinweise können die genaue Anamnese mit Erfragung von Kontakt mit Katzen, Laborwerte und Ultraschalluntersuchung der betroffenen Lymphknoten geben. Ein universelles Verfahren gibt es noch nicht. Es wird empfohlen, mehrere der obengenannten Verfahren miteinander zu kombinieren um eine wirkliche Sicherheit bei der Diagnose zu gewährleisten [124].

Differentialdiagnostisch sollten neben einer Lymphadenopathie im Rahmen einer Infektion mit *B. henselae* maligne Prozesse, genauso wie Infektionen mit anderen Erregern, wie z.B. Epstein-Barr-Virus, Zytomegalievirus, *Toxoplasma gondii*, *Mycobakterium tuberculosis* oder auch atypische Mykobakterien bedacht werden.

3.1.7 Therapie

Die Therapie der Wahl bei der KKK hängt sehr vom Schweregrad der Erkrankung ab. Bei der Behandlung einer typisch verlaufenden KKK bei immunkompetenten Patienten ist in der Regel eine konservative Therapie mit eventueller Schmerztherapie ausreichend. Die Erkrankung ist selbstlimitierend und bildet sich innerhalb von 2 – 6 Monaten spontan zurück. Stark vergrößerte und abszedierte Lymphknoten können bei Bedarf sonographisch dargestellt und Punktiert oder Exzidiert werden. Antibiotikum der Wahl bei Komplikationen ist Azithromycin [125].

Bei leichten systemischen Infektionen mit mildem Krankheitsverlauf sind Makrolide (Clarithromycin oder Azithromycin) oder Doxycyclin eventuell auch in Kombination mit Gentamicin oder Rifampin indiziert. Bei schweren Infektionen ist eine Kombination von Doxycyclin mit Rifampicin Mittel der Wahl [125] [126]. Abhängig vom Immunstatus des Patienten und der Schwere der Erkrankung sollte die nötige Therapie zwei Wochen bis zwei Monate durchgeführt werden [127].

Insgesamt ist festzustellen, dass es bis heute kaum kontrollierte Studien zu Therapieoptionen und Outcome von Bartonella Infektionen gibt.

3.2 Makrophagen

Makrophagen gehören zu den Zellen des Immunsystems und spielen bei der Abwehr von intrazellulären Erregern, also auch bei der Abwehr von Bartonellen, eine wichtige Rolle.

Eli Metchnikow beobachtete 1880 große mononukleäre phagozitierende Zellen in Seesternen. Er beschrieb als erster das Prinzip der Phagozytose und gab den beobachteten Zellen den Namen Makrophagen [128]. In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde vermehrt die Funktion der Gewebemakrophagen (Histiozyten) beschrieben. Darauf aufbauend wurde das Prinzip des retikuloendothelialen Systems (RES) entwickelt, welches in den späten sechziger Jahren zum mononukleär-phagozytierenden System (MPS) erweitert wurde [129]. Verglichen mit anderen Zellen erwies sich in den Folgejahren die Untersuchung der Zellbiologie von Makrophagen als schwierig. Erst ab Mitte der 1980er Jahre wurden neue Erkenntnisse über die Bedeutung von Makrophagen gewonnen. So wurde im Rahmen der Forschungen die Makrophagen betreffend, ein bis dahin unbekanntes Zytokin entdeckt, der Tumornekrosefaktor (TNF). Es wird von Makrophagen, nach Kontakt mit Lipopolysaccharid (LPS), welches ein Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien darstellt, produziert [130]. Makrophagen gehören zu den Fresszellen und sind als mononukleäre Leukozyten ein wichtiger Bestandteil des zellulären Immunsystems. Sie werden im Knochenmark aus hämatopoetischen Blutstammzellen zu Monozyten ausgebildet, gelangen von dort für etwa 24h in den Blutkreislauf, bevor sie dann an Endothelzellen adhärieren und durch die Interzellulärspalten die Gefäße verlassen bzw. auf einen Entzündungsherd zuwandern [131]. Dieser Vorgang ist als Diapedese bekannt. Die letztendliche Ausdifferenzierung erfolgt unter dem Einfluss von körpereigenen Zytokinen sowie durch Erregersubstanzen wie LPS oder formyl-Methionyl Leucyl-Phenylalanin (fMLP) in den verschiedenen Zielgeweben [132] [133]. Sie stellen dort keine konstante Zellpopulation dar, sondern werden ständig durch ihren Einsatz verbraucht und erneuert. Abhängig von der Lokalisation in ihrem jeweiligen Zielgewebe werden die Zellen des MPS unterschiedlich benannt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Lokalisation und Bezeichnung der Zellen des MPS (Auszug aus [134])

Lokalisation	Bezeichnung
Knochenmark	Monoblasten Promonozyten Monozyten Makrophagen
Peripheres Blut	Monozyten
Gewebe/Organe	
• Bindegewebe	Histiozyten
• Lunge	Alveolarmakrophagen
• Leber	Kupffer-Sternzellen
• Milz	Makrophagen der roten Pulpa <ul style="list-style-type: none"> • Marginalzonen Makrophagen • Metallophilische Marginalmakrophagen
• Knochen	Osteoklasten
• ZNS	Mikroglia
Körperhöhlen	Pleurale Makrophagen Peritoneale Makrophagen
Entzündungen	Exsudat Makrophagen

In den jeweiligen Organen und Geweben erfüllen Makrophagen mehrere Aufgaben. Einerseits die Phagozytose von Mikroorganismen, apoptotischen Zellfragmenten oder Zellen, andererseits als antigenpräsentierende Zellen, welche anderen Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise T-Lymphozyten, prozessiertes fremdes Material (=Antigen) auf Oberflächenrezeptoren (sogenannte major histocompatibility complex (MHC) Klasse II-Moleküle) zur Verfügung stellen [135]. Die Makrophagen synthetisieren und sezernieren mit dem granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [136] und dem macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) [137] mindestens zwei hämatopoetische Wachstumsfaktoren, welche die Funktion und Produktion der mononukleären Leukozyten stimulieren. Zusätzlich werden Zytokine wie IL-1 und TNF- α produziert, welche wiederum nicht hämatopoetische Zellen wie Endothelzellen, oder Fibroblasten zur Produktion von GM-CSF und M-CSF anregen.

Im Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu den gewebsspezifischen Makrophagen kommt es zu einer Reihe von funktionalen und strukturellen

Änderungen an und in den Zellen, diese Veränderungen sind auch, wie in Abbildung 2 zu sehen, mikroskopisch erkennbar. Die ausdifferenzierten Makrophagen sind größer als die Monozyten und das Zytoplasma enthält eine größere Anzahl zellulärer Bestandteile, wie Vakuolen, Granula und Lysosomen. Außerdem ist sowohl die Anzahl als auch die enzymatische Aktivität der Mitochondrien erhöht. Sie sind verstärkt zur Phagozytose fähig und durch eine erhöhte Produktion von Sauerstoffradikalen vermehrt mikrobizid und tumorizid. Zusätzlich werden eine Vielzahl von Rezeptoren für Komplementproteine, Lipoproteine, Chemokine, Immunglobuline und Zytokine ausgebildet um spezifische Aktivitäten wie Wachstum, Aktivierung, Endozytose, Pathogenerkennung, Migration und Sekretion zu kontrollieren. Zudem werden Enzyme, Koagulationsfaktoren, Komplementkomponenten und Zytokine sezerniert. Dadurch können die ausdifferenzierten Makrophagen in Interaktion mit den Zellen der Umgebung und den Mediatoren des Immunsystems treten. So ausdifferenziert nehmen sie an der Antigenprozessierung und Präsentation teil [138].

Eine weitere wichtige Rolle bei der pathologischen Angiogenese, die im Rahmen von *B. henselae* Infektion verursachten vaskuloproliferativen Erkrankungen zu beobachten ist, spielt die Interaktion zwischen den Zellen des MPS und Endothelzellen. Durch histologische Untersuchungen von BA-Läsionen, konnte festgestellt werden, dass polymorphekernige Leukozyten und Makrophagen die Läsionen im Rahmen einer BA infiltrieren [51] [50].

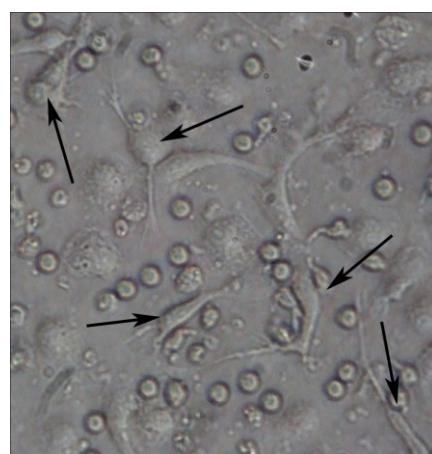


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahme (400x Vergrößerung) von primären humanen Makrophagen (Pfeile) nach 3 d Stimulation mit GM-CSF in 24-Well Platte. Auffällig sind die deutlich sichtbaren Ausläufer.

3.2.1 THP-1 Monozyten

THP-1 Monozyten sind eine Zelllinie, die ursprünglich aus dem Blut eines an akuter monozytärer Leukämie erkrankten einjährigen Jungen isoliert wurde. Sie weisen die typischen Merkmale von Monozyten auf, wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Phagozytose und die Produktion von Lysozymen und die Ausschüttung von spezifischen Zytokinen. Die Zellen wachsen in Suspension und bilden zum Teil lockere Anhäufungen. Durch Behandlung mit Phorbolestern (PMN) differenzieren sie zu Makrophagen und werden adhärent [139].

3.3 Zytokine

Zytokine sind eine uneinheitliche Gruppe von Peptiden, Proteinen und Glykoproteinen von kurzer Halbwertszeit und wirken als interzelluläre Mediatoren der Kommunikation durch Modulation der Aktivität einzelner Zellen und Gewebe. Sie haben eine atomare Masse (M_r) von 8-40 kDa und werden vorwiegend von Zellen des retikuloendothelialen Systems wie z.B. Monozyten, Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet und sezerniert [140]. Sie sind äußerst potent und erzielen ihre Effekte schon bei sehr niedrigen Konzentrationen [141] [142]. Sie können sowohl systemisch, wie endokrine Hormone, agieren, als auch auto- und parakrin. Durch Bindung an spezifische Rezeptoren mit hoher Bindungsaktivität werden einzelne oder ganze Kaskaden von zelleigenen Aktionen ausgelöst und somit die Aktivität der Zielzelle koordiniert. Die Regulation der Produktion von Zytokinen erfolgt auf transkriptioneller und translationaler Ebene. Mit Hilfe der Inaktivierung durch lösliche Rezeptoren und andere Inhibitoren, Sekretion oder die asynchrone Expression membranständiger Zytokinrezeptoren kann die Zytokinwirkung auch post-translational reguliert werden [143].

Die Funktion der Zytokine im Zusammenhang mit dem Immunsystem und der Hämatopoese war der erste Bereich welcher genauer untersucht wurde. Hier regulieren sie hauptsächlich das Wachstum der Zellen, ihre Chemotaxis (die Steuerung der Fortbewegung) sowie ihre Differenzierung und Aktivierung. Zytokine wirken bei zellspezifischen Aktionen wie der Apoptose, dem programmierten Zelltod, genauso wie bei systemischen Reaktionen,

beispielsweise Akute-Phase Reaktionen, Fieber, Schock und Wundheilungsprozessen [144] [145]. Generell wird zwischen proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-1 α / β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-23, TNF- α und IFN- γ und den antiinflammatorischen Zytokinen wie z.B. dem IL-1-Rezeptorantagonisten, IL-4, IL-10, IL-11 und TGF- β unterschieden. Letztendlich trägt das lokale Gleichgewicht zwischen diesen beiden Gruppen wesentlich dazu bei, ob eine Erkrankung chronifiziert oder der Erreger eliminiert wird.

Auch im Rahmen von Stress-Situationen konnte ein Zunahme der regulatorischen Zytokine festgestellt werden [146].

3.3.1 Das Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

TNF- α ist ein pleiotropes proinflammatorisches Zytokin, welches in vielen Zelltypen als Teil einer Reaktion auf Zellschädigung auftritt.

Es war eines der ersten bekannten Zytokine. Schon 1975 wurde es erstmalig im Serum von mit Lipopolysacchariden (LPS) behandelten Mäusen nachgewiesen und erhielt seinen Namen wegen der nekrotisierenden Effekte bei malignen Tumoren. Es wurde als ein durch Leukozyten produzierter Faktor mit unterschiedlichen Funktionen beschrieben: Inhibition des in vitro-Wachstums von Tumorzellen, Induktion von Nekrosen in transplantierten Tumoren bei Versuchstieren und Hemmung der Lipoproteinlipase bei chronischen Infekten und in der Folge eine verminderte Aufnahme und Speicherung von Triglyceriden durch das Fettgewebe [147]. 1985 wurde ein Protein aus LPS-behandelten Makrophagen isoliert und wegen seiner Fähigkeit der Inhibition der Lipoproteinlipase und der daraus gemutmaßten Beteiligung an der Kachexie, als Kachektin bezeichnet [148]. 1989 konnte festgestellt werden, dass Kachektin und TNF- α identisch sind [149]. Gemeinsam mit TNF- α -Rezeptoren aktivieren LPS über den TLR4/CD14 Rezeptor NF- κ B, einen Transkriptionsfaktor für TNF- α und andere Zytokine. TNF- α ist nach der Translation zunächst zellmembranständig, bis es durch die Protease TACE als Polypeptid freigesetzt wird. Die Abbildung 3 zeigt die Kristallstruktur von freiem TNF- α . Jede dieser Untereinheiten des biologisch aktiven Homotrimers von

TNF- α hat eine atomare Masse (M_r) von etwa 17 kDa und wird überwiegend durch ubiquitär vorkommende Makrophagen produziert [150]. In der löslichen Form liegt es als 51 kDa Homotrimer vor, welches teilweise an lösliche TNF-Rezeptoren gebunden ist. Das Gen für TNF- α liegt beim Menschen auf Chromosom 6 (6p23-6q12) [151].

TNF- α vermittelt seine Wirkung auf zellulärer Ebene durch zwei spezifische Oberflächenrezeptoren, die unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden ansteuern. TNF-Rezeptor-1 wird hauptsächlich durch das lösliche TNF- α aktiviert und führt zur Apoptoseinduktion [152], während der TNF-Rezeptor-2 bevorzugt durch das membranständige TNF- α aktiviert wird und zur Unterdrückung der Apoptose führt [153].

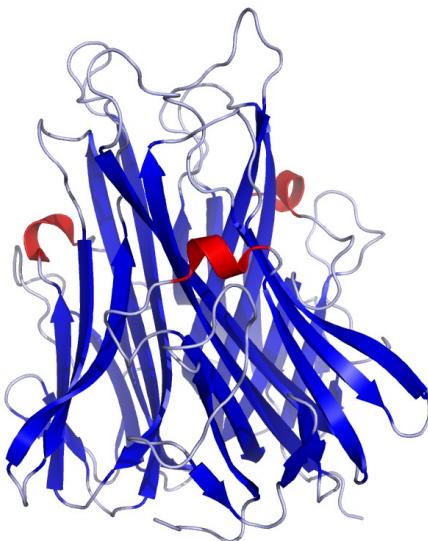


Abbildung 3: Darstellung der Kristallstruktur von TNF- α auf Basis der Protein Data Bank (PDB: 1TNF) hergestellt. [197]

3.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Als fakultativ intrazelluläres Bakterium interagiert *Bartonella* stark mit den Zellen des infizierten Wirtes. Die näheren Untersuchungen dieser Interaktionen konnten in den letzten Jahren die Erkenntnisse über die Virulenz und Pathogenitätsstrategien von *Bartonella* erweitern. Erythrozyten, Endothelzellen aber auch Progenitorzellen des Knochenmarks standen bisher im Fokus der Forschung [154] [45] [155] [64]. Die Interaktion mit Zellen des MPS ist bisher nur sehr wenig untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Interaktion zwischen *B. henselae* und humanen Makrophagen zu untersuchen. Hierbei wurde die monozytäre Zelllinie THP-1 und primär gewonnenen Makrophagen untersucht.

Im ersten Schritt wurde erhoben, ob *B. henselae* an die Zellen der monozytären Zelllinie THP-1adhäriert, ob er sie infiziert und ob und wie lange das Bakterium intrazellulär überlebt.

Des Weiteren stand die Auslösung der Zytokinantwort und deren Art im Fokus unserer Versuche. Untersucht wurde zunächst, ob sich nach wiederholter Passage der Bakterien, die Fähigkeit des intrazellulären Überlebens und TNF- α Ausschüttung der infizierten Makrophagen ändert.

Zur näheren Untersuchung des Mechanismus der Auslösung der Zytokinantwort wurden die Reaktionen des Makrophagen auf subkultivierte und hitzegetötete Bakterien mit denen von lebenden, nicht-subkultivierten verglichen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend mit primär gewonnenen humanen Makrophagen bestätigt.

Abschließend wurden die Bindung und intrazelluläre Lokalisation von Bartonellen in Makrophagen licht- und elektronenmikroskopisch dokumentiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag dazu leisten, die Mechanismen der Pathogenität und Persistenz von *B. henselae* besser zu verstehen.

4 Material

Die Verwendeten Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien sind in der Folge aufgeführt.

4.1 Geräte

Artikel	Firma	Firmensitz	Artikelnummer/Typ
Sterile Box „BIOWIZARD“	Kojair		KR-130 BW
Zentrifuge „Megafuge“	Heraeus	Hanau	1.0 R
Zentrifuge „Biofuge“	Heraeus	Hanau	
Brutschrank „Heracell“	Heraeus	Hanau	240
Kühlschrank	Liebherr		Profi line
Gefrierschrank Minus 80			
Mikroskop	Olympus		CKX 41
Digitalkameraaufsatz	Olympus		DP25
ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH	Grödig, Österreich	
Vortexer	VWR international		444-1372
Brenner	Gasprofi 2		WLD-TEC
Rüttler	Sarstedt	Nümbrecht	CM-9
MiniMACS Separator	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	
FACSCalibur flow cytometer	BD	Heidelberg	
MACS Multistand	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	
MS Column	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	
Kolbenhubpipetten	Eppendorf	Hamburg	17150
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf	Hamburg	146944210
Libra 120 transmission Elektronenmikroskop	Carl Zeiss	Jena	

4.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma	Firmensitz	Order.No.
TC plate 24-Well f. Zellkultur	Greiner	Frickenhausen	662160
Pipette 5,0 ml	Greiner	Frickenhausen	606180
Pipette 10,0 ml	Greiner	Frickenhausen	607180
Ultra low attachment cluster 6-Well Platten	Costar corning	NY, USA	CLS 3516-50EA
Pipette 25,0 ml	Greiner	Frickenhausen	760180
Drigalski Spatel Glas	Roth	Karlsruhe	K 724.1
Drigalski Spatel Metall	Roth	Karlsruhe	K 732.1
Pipettenspitze gelb	A. Baack		BAA 401 000 60
Pipettenspitze blau	A. Baack		BAA 401 000 61
Klebeband rot	ZAP neolab	Heidelberg	2 - 3253
Klarsichtbeutel	ZAP neolab	Heidelberg	68911540
Schottflaschen 100 ml	ZAP neolab	Heidelberg	E - 2057
Schottflaschen 250 ml	ZAP neolab	Heidelberg	E - 2058
Schottflaschen 500 ml	ZAP neolab	Heidelberg	E - 2059
Sterilfilter 0,45 µm	Roth	Karlsruhe	5996.1
Autoclavierband	ZAP neolab	Heidelberg	2 - 7005
Kryo-Aufbewahrungsboxen	ZAP neolab	Heidelberg	7 - 8040
Objektträgerkästen für 100	ZAP neolab	Heidelberg	2 - 2435

Stk.

Immuno-F16 maxisorb Platten Objektträger, gebrauchsfertig, Matrand, geschnitten,	Nunc Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik GmbH	Hanau Edermünde	469914
Cover Glasses 12mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG	Sondheim	

4.3 Sonstige Medien

Artikel	Firma	Firmensitz	Order. No.
10x DPBS w/ CaCl ₂ w/ MgCl ₂	GIBCO BRL	NY, USA	14200-067
Aqua ad inyectabilia	Baxter S.A.	Lessines, Belgien	28707011
Penicillin/Streptomycin	GIBCO BRL	NY, USA	15140-122
TNF-alpha ELISA set	Pharmingen/BD	Canada	555212
Accutase	PAA Laboratories	Pasching, Österreich	LK11-07
Monocyte Isolation Kit II human	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	
Trypsin	GIBCO BRL	NY, USA	25300-054
Trypanblau	GIBCO BRL	NY, USA	15250-061
Paraformaldehyd			
Ficoll-Paque Premium	GE Healthcare Bio-Science AB	Uppsala, Schweden	17-5442-03
Prolong Gold antifade reagent (Mounting Medium)	Invitrogen		P36930
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) [2 mg/ml]	Invitrogen™ Molecular Probes	Karlsruhe	A11034
Alexa Fluor® 647 goat anti-rabbit IgG (H+L) [2 mg/ml]	Invitrogen™ Molecular Probes	Karlsruhe	A21245
VECTASHIELD® HardSet™ with DAPI	Vector Laboratories	UK	H-1500

4.4 Kulturmedien

Artikel	Firma	Firmensitz	Order.No.
RPMI 1640 + Glutamax 1x	GIBCO BRL	NY, USA	61870-044
PMA			
GMCSF Premium Human aus E.Coli	Strathmann Biotec	Hamburg	9511091
FCS	GIBCO BRL	NY, USA	10270-106
Fildes Extract	Oxoid	Basingstoke, UK	SR0046
Hämin	Sigma-Aldrich	Buchs, Schweiz	51280
Brucella Broth	BectonDickinsonCo.	NY, USA	211088
Foetal Bovine Serum Gold (FBS)	PAA Laboratories	Pasching, Austria	A 15-649

5 Methoden

5.1 Aufbereitung für die Erhaltung der Bakterien bei -80°C

Um eine bei den Versuchen konstante Zellzahl zu gewährleisten und um einen schnellen Zugriff auf die Bakterien zu haben, wurden der *B. henselae* Stamm in Zellkulturmedium (RPMI 1640) und Glycerin in Aliquots á 1ml bei -80°C eingefroren.

Wir benutzten den *B. henselae* Stamm Berlin 1, das erste europäische Bakterium, welches aus den BA-Läsionen eines HIV-infizierten Patienten isoliert wurde [156]. Dabei wurde sowohl vor dem poolen als auch vor und nach der Glycerinzugabe im Rahmen des Einfriervorgangs die Keimzahl mithilfe der seriellen Verdünnungsreihe bestimmt um eine konstante Keimzahl für die Versuche zu gewährleisten.

5.2 Bestimmung der Keimzahl der Bakterien durch erstellen einer seriellen Verdünnungsreihe

Die Erstellung einer seriellen Verdünnungsreihe ist eine sehr genaue Möglichkeit um die Zahl von Keimen in einer Flüssigkeit zu bestimmen. Man verdünnt dabei die keimenthaltende Flüssigkeit in genau definierte Verdünnungen und gibt dann eine definierte Menge dieser Verdünnung auf einen möglichst idealen Nährboden für das bestimmte Bakterium. Dort bildet jedes einzelne Bakterium nach entsprechender Bebrütung eine Kolonie (Koloniebildende Einheit (KBE)) und die vorher nur mikroskopisch erkennbaren einzelnen Bakterien können nun makroskopisch als Kolonie erkennbar, gezählt werden. Durch Einbeziehung und Mittelung der unterschiedlichen Verdünnungsgrade kann nun die genaue Keimzahl errechnet werden.

Durchführung:

Initial wurden leere Kochsalzröhrchen entsprechend dem Verdünnungsgrad vorbereitet und mit je 900 µl einer mit Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (PBS) gefüllt. Genau 100 µl einer Bakteriensuspension mit der fraglichen

Keimzahl wurde ebenfalls in ein Kochsalzröhrchen überführt. Anschließend wurde mit je einer neuen sterilen Pipettenspitze jeweils 100 µl der Bakterienverdünnung in das nächste Röhrchen überführt und dadurch jeweils wieder 1:10 verdünnt. Vor der Überführung in das nächste Kochsalzröhrchen wurde jeweils erst mit der sterilen Pipettenspitze gemischt und dann für 10 Sekunden gevortext.

Von den so erhaltenen Verdünnungen wurden zuerst jeweils 100 µl der Bakteriensuspension auf Columbia Agar mit 5 % Schafsblood pipettiert und gleichmäßig mit dem Drigalski-Spatel ausplattiert. Die Agarnährböden wurden anschließend in einen Klarsichtbeutel verpackt und bei 37°C mit 5 % CO₂ bebrütet. Nach mindestens zehn Tagen Bebrütung wurde durch das Zählen der nun makroskopisch wie in Abbildung 6 erkennbaren Kolonien die Keimzahl bestimmt.

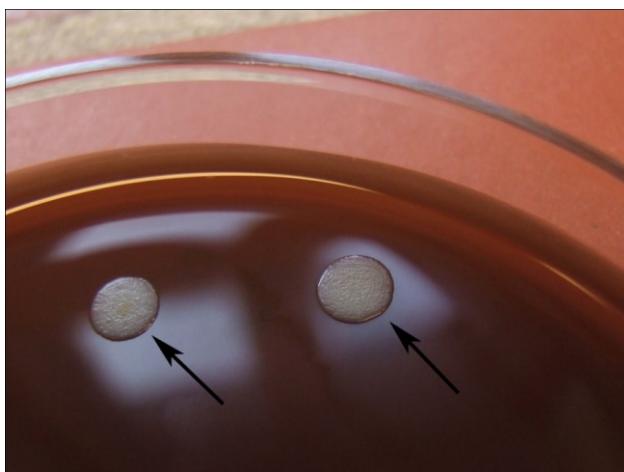


Abbildung 4: Aufnahme von zwei Kolonien (Pfeile) auf der Oberfläche eines Agarnährbodens (Columbia Agar mit 5% Schafsblood) nach zehn Tagen Bebrütung.

5.3 Bakterienanzucht für in vitro Infektionen

Für alle Versuche in denen mit *B. henselae* gearbeitet wurde, entnahmen wir dem -80°C Gefrierschrank die Bakterien B1-SK1 und/oder SK 50 und ließen sie bei Raumtemperatur für 20 min auftauen. Diese Suspension diente als Vorkultur und wurde als Inokulum für die Herstellung der frischen Bakteriensuspension benutzt. Die Nährboullion (Brucella-Broth mit Fildes Extrakt und Hämin) wurde

vor der Beimpfung für 30 min bei 36°C vorgewärmt. Im Anschluss wurden bei B1-SK1 0,4 ml Inokulum und bei B1-SK50 0,1 ml Inokulum in 45 ml Nährbouillon in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Bakterien wurden dann bei 37°C und 5% CO₂ bis zum Ende der in Vorversuchen ermittelten maximalen Vermehrungsrate inkubiert. In der Abbildung 5 ist der typische Wachstumsverlauf des von uns verwendeten Stammes mit dem Zeitpunkt der maximalen Vermehrungsrate (Pfeil) zu erkennen.

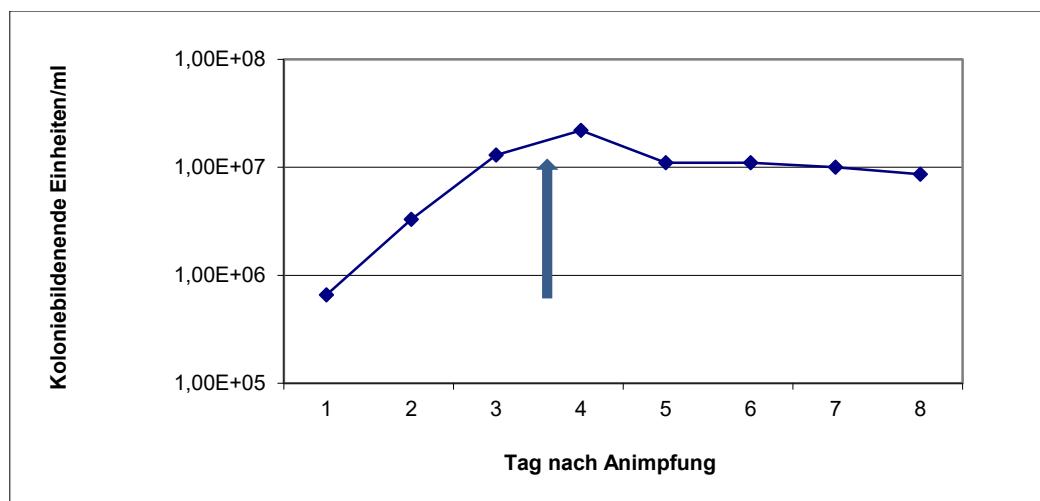


Abbildung 5: Typischer Wachstumsverlauf mit Tag der Ernte bzw. der Verwendung von Bartonella am Beispiel B1-SK1 in Flüssigkultur.

5.4 Herstellung von hitzegetöteten Bakterien

Die Bakterien wurden wie oben beschrieben angezüchtet und die Keimzahl bestimmt. Anschließend wurden sie durch Behandlung in einem Wasserbad über 30 Minuten bei 65°C inaktiviert. Zur Kontrolle der Abtötung wurden 2 x 10 µl der Bakteriensuspension auf Columbia Agar ausplattiert und nach 2-wöchiger Inkubation im Brutschrank auf eventuelles Wachstum kontrolliert. Die inaktivierten Bakterien wurden sofort verwendet.

5.5 Kultivierung der Zelllinie THP-1 und Vorbereitung für den Infektionsversuch

Die THP-1 Zellen wurden in eine Zellkulturflasche mit Zellkulturmedium (RPMI mit Glutamax, 10% FKS, 100ng/ml Phorbol 12-Mystrat 13-Acetat (PMA)) gesät

und alle zwei Tage subkultiviert. Drei Tage vor der Infektion wurden sie dann mithilfe einer Bürker-Zählkammer gezählt, auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und in eine 24-Well Platte überführt. In der Abbildung 5 sind beispielhaft zwei Gesichtsfelder mit unterschiedlichen Verdünnungsgraden zu sehen. Nun wurde PMA (10 µg/ml) in das Nährmedium gegeben und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit über den Zellen vorsichtig abgenommen und die Zellen zweimal mit 1 ml Vollmedium gewaschen, daraufhin wurde erneut 1 ml Vollmedium je Well hinzugegeben und die Zellen zwei weitere Tage bis zur Infektion bebrütet.

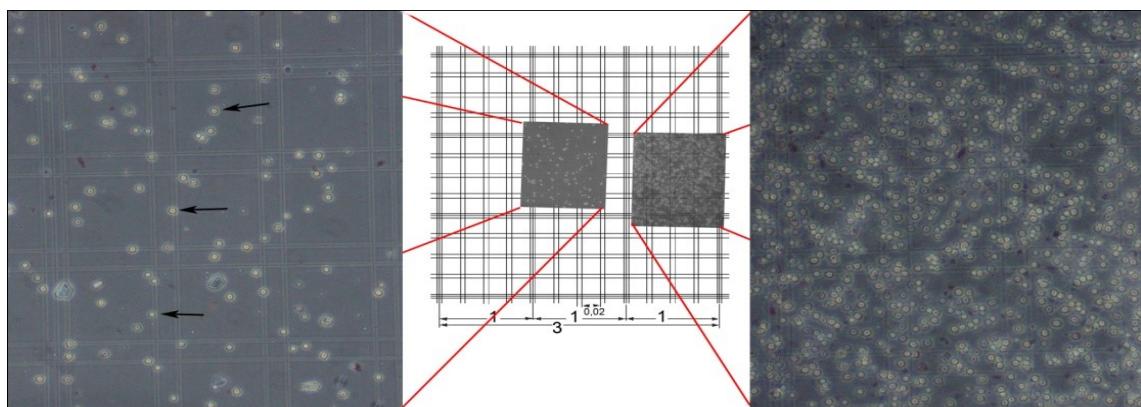


Abbildung 6: Fotos von Gesichtsfeldern im Lichtmikroskop (200x Vergrößerung) per Digitalkamera angefertigt.

Links: Deutlich sichtbare gutzählbare Einzelzellen.

Mitte: Schematische Zeichnung mit entsprechendem Ort des Gesichtsfeldes auf einer Bürker-Zählkammer (Größenangaben in mm).

Rechts: Die Verdünnung ist zu niedrig, ein adäquates Auszählen ist nicht möglich.

5.6 Vorbereitung der Bakterien für Infektionsversuche

Zur Gewährleistung einer sowohl für die Versuche ausreichenden Konzentration der verwendeten Bakterien, als auch zur Verringerung von ergebnisverfälschenden Bestandteilen der Nährbouillon in der Bakteriensuspension, wurden die nach der obengenannten Methode bis zu Infektionstag bebrüteten Bakterien vor Infektionsbeginn schonend gewaschen und auf eine klar definierte Konzentration eingestellt. Wegen des beim Waschen praktisch nicht verhinderbaren Zellverlustes wurde vor Beginn jeder Infektion noch einmal eine Keimzahlbestimmung mithilfe der seriellen Verdünnungsreihe im Duplikat vorgenommen.

Durchführung:

Am Infektionstag wurde die Keimzahl der Bartonellen in der Flüssigkultur bestimmt. Hierzu wurde die Bakteriensuspension erst durch zehnfaches auf- und abziehen mit einer 10 ml Pipette gemischt und anschließend 1 ml für die oben beschriebene Keimzahlbestimmung entnommen. Um die für den Versuch benötigte Konzentration und Reinheit der Bakterien zu erhalten, wurden sie wie folgend beschrieben sorgfältig gewaschen: Durch Zentrifugation für 30 min bei 3345 x g ab 200 rpm (8 x g) ohne Bremse bei 10°C Temperatur und anschließendes vorsichtiges abkippen des Überstandes bis auf 1 ml Restvolumen. Das Sediment wurde dann durch sanftes auf und abziehen resuspendiert, und mit PBS wieder auf das Ausgangsvolumen von 45 ml aufgefüllt und nochmal zentrifugiert.

Falls mehr Bakterien und daraus resultierend zwei oder mehr Reaktionsgefäß für den Versuch benötigt wurden, poolten wir an dieser Stelle erneut 2 Sedimente. Die 50-fache Konzentration wurde durch Reduktion des Ausgangsvolumen auf ein Fünftel, d.h. 0,9 ml pro Reaktionsgefäß erreicht. Die geplante Multiplicity of Infection (MOI, dt. Multiplizität der Infektion) wurde erreicht, indem das Volumen mit einer Variabelvolumen-Pipette gemessen und auf das gewünschte Volumen der geplanten MOI mit Zellkulturmedium aufgefüllt wurde. Anschließend wurde vorsichtig resuspendiert und für 2 min auf dem Schüttler bei 70 rpm inkubiert. Danach konnte nach Keimzahlbestimmung die Infektion erfolgen.

5.7 Ablauf der Infektion von Makrophagen mit *B. henselae*

Das Ziel dieses Versuches ist es, einer bestimmten festgelegten Zahl von Zellen eine bestimmte festgelegte Zahl von Bakterien gegenüberzustellen. Anschließend wird die Zahl der Bakterien bestimmt,

- a. die insgesamt fest an die Zelle gebunden werden (Adhärenz),
- b. die in einem bestimmten Zeitraum von der Zelle aufgenommen werden (Internalisierung)
- c. die innerhalb der Zelle für einen bestimmten Zeitraum überleben (Persistenz).

Durchführung:**Infektion:**

Die nach oben genanntem Schema vorbereiteten Zellen wurde das Zellkulturmedium abgezogen und sie wurden mit 1 ml vorgewärmten Zellkulturmedium gewaschen. Anschließend wurde je 1 ml Zellsuspension pro Well hinzugegeben und durch Zentrifugation bei 754 x g, ab 200 rpm (8 x g) ohne Bremse, 22°C für 10 min die Bakterien in die Nähe der Zellen gebracht.

Adhärenz:

Nach zwei Stunden wurde den infizierten Zellen das Medium abgezogen und zwei Mal mit Zellkulturmedium gewaschen. Anschließend wurde das Medium wieder komplett abgezogen und 200 µl Trypsin je Well zugegeben und fünf Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die abgelösten Zellen aus drei Wells wurden mit einem Zellkratzer zusätzlich mechanisch gelöst und in einem Eppendorfgefäß gepoolt. Anschließend wurden zusammengehörige Wells mit je 0,2 ml PBS ausgewaschen und ins dazugehörige Eppendorfgefäß überführt. Mit weiteren 0,3 ml PBS wurden dann noch einmal die Wells ausgewaschen. Die gepoolten Zellen wurden dann für 5 min bei 2700 x g, bei 10°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nun lysiert, indem man das Sediment in 0,9 ml Aqua ad iniecatilia aufnahm und daraufhin für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubierte. Zum Beenden des Lysevorgangs wurde 100 µl 10 x PBS pro Eppendorfgefäß steril zugegeben. Von den so erhaltenen Bakteriensuspensionen wurde die Keimzahl wie oben beschrieben bestimmt.

Internalisierung und Persistenz:

Zwei Stunden nach Infektion wurde das Medium abgezogen und zwei Mal mit 1 ml Medium je Well gewaschen. Anschließend wurde 5% Gentamycin Verdünnung pro Well hinzugegeben um die nicht internalisierten Bakterien abzutöten und weitere zwei Stunden inkubiert. Für die Persistenzversuche wurde nach weiteren 2 Stunden erneut gewaschen und die Konzentration auf 1% Gentamycin verringert. Daraufhin wurde je nach Versuchsaufbau weitere Stunden inkubiert.

Nach der versuchsabhängigen Inkubationszeit wurden die Zellen wieder wie oben beschrieben trypsiniert, lysiert und die Keimzahl bestimmt.

5.8 Gewinnung von Überständen

Um die Ausschüttung von Zytokinen als Reaktion der Zellen auf die Infektion auszuwerten, wurden die Überstände der Wells gewonnen. Im Wissen um die Labilität der Zytokine nahmen wir alle Versuchsschritte möglichst zügig und auf Eis vor.

Durchführung:

Die Zellen wurden entsprechend dem obengenannten Gentamycin Essay infiziert. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wurde, möglichst Nahe der Flüssigkeitsoberfläche, um Verfälschungen durch Zellirritation oder Verunreinigung zu vermeiden, 500 µl Überstand pro Well abgenommen und in eisgekühlte Eppendorfgefäß überführt. Jetzt wurde um die Reinheit der Probe zu erhöhen für 5 Minuten bei 300 x g und 10°C zentrifugiert, dann 400 µl Überstand je Eppendorfgefäß entnommen und in ein neues eisgekühltes Eppendorfgefäß überführt, erneut mit der Pipette gemischt und abschließend zwei Mal je 120 µl Überstand in zwei weitere Eppendorfgefäß überführt. Die daraus entstandenen Aliquots wurden zügig bei -20°C eingefroren.

5.8.1 Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) der Überstände

ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, durch das verschiedene Stoffe in einer Probe nachgewiesen werden können. Ein Antikörper bindet sehr spezifisch an einen bestimmten Antigen, in unserem Falle das TNF-α. An diesen Antikörper ist ein Enzym gebunden, welches eine Farbreaktion katalysiert, das in einem funktionellen Verhältnis zur Konzentration des Stoffes in der Probe steht. Zur quantitativen Darstellung der Stoffkonzentration wird eine Eichkurve mit bekannten Stoffkonzentrationen erstellt.

Wir verwendeten das spezielle Double-Antibody-Sandwich ELISA, bei dem initial sogenannte Capture-Antikörper an eine feste Phase gebunden werden (hier die 96-Well Platte). Diese Capture-Antikörper binden mit ihrer zweiten Bindungsstelle, bei Zugabe einer den zu detektierenden Stoff beinhaltenden Flüssigkeit, fest an ein bestimmtes Epitop auf dem Antigen und fixieren es so auf der festen Phase. Anschließend binden sogenannte Detection-Antikörper an ein anderes Epitop des soeben fixierten Antigens. An die zweite Bindungsstelle dieser Detection-Antikörper ist ein Enzym gebunden, welches bei Zugabe einer zum Enzym passenden chromogenen Substanz den gewünschten Farbumschlag katalysiert. Die Intensität des Farbumschlags kann dann mit einem Photometer gemessen werden.

Durchführung:

Als erstes wurden die 96-Well Platten mit den Capture Antikörpern beschichtet. Dazu wurden die Antikörper im Verhältnis 1:250 mit Coatingbuffer verdünnt und 50 µl davon je Well pipettiert. Die nun beschichteten Platten wurden bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Um die noch freien Bindungsstellen auf der Platte zu blocken, wurden die Platten drei Mal mit Waschpuffer gewaschen und in der Folge mit 200 µl Blockingreagenz je Well geblockt. Danach wurden sie für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Proben für die Eichkurve wurden, nachdem die Wells wieder jeweils zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen worden sind, aufgetragen. Dazu wurde die TNF-α-Stock Solution in der Konzentration von 100 ng/ml aus dem -80°C Kühlschrank genommen und auf 2 ng/ml eingestellt, indem man sie 1:50 mit Blocking Reagenz verdünnte. Diese Verdünnung wurde dann im Verhältnis 1:2 weiter verdünnt bis eine Konzentration von 2 pg/ml erreicht wurde. Die Verdünnungen von 2 ng/ml bis 2 pg/ml wurden dann als Eichkurve verwendet und im Duplikat auf die Platten aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde im Duplikat 50 µl/Well Assay Diluent mit 5% BSA verwendet. Danach wurden die Platten erneut bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nun wurde 75 µl je Well vom Working Detector hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor 75 µl Indikatorsubstrat je Well hinzugegeben wurde, wurden die Wells erneut acht Mal mit Waschpuffer gewaschen und

zwischen den Waschschriften jeweils eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Um die Reaktion zu stoppen wurde 50 µl Stop solution in jedes Well pipettiert und dann sofort die Farbintensität mit dem Photometer bei 450 nm gemessen.

5.9 Isolierung von primären humanen Makrophagen durch das Magnetic Labeled Bead Cell Separation Verfahren

Im Rahmen der Vollblutspende entstehen bei deren Verarbeitung zu Erythrozytenkonzentraten und gefrorenem Frischplasma sogenannte Buffy Coats (engl. buff: lederfarben, coat: Schicht) als Nebenprodukt. Es handelt sich hierbei um die Grenzschicht die zwischen den Erythrozyten und dem Blutplasma entsteht, wenn man Vollblut mit einem Gerinnungshemmer versetzt und zentrifugiert. Sie beinhaltet alle Zellen exklusive der Erythrozyten.

Monozyten besitzen alle zwar gewisse einheitliche morphologische, biochemische und funktionelle Charakteristika [157], jedoch unterscheiden sie sich abhängig vom Grad ihrer Entwicklung sehr. Frisch isolierte periphere Blutmonozyten unterscheiden sich unter anderem in Größe, Dichte, funktionellen Kapazitäten und Expression von Oberflächenkapazitäten [158]. Bei der Arbeit mit frisch isolierten primären Makrophagen kann es aufgrund der sehr vielfältigen parallel bestehenden Entwicklungsstadien der Makrophagen im Blut, zu sehr unterschiedlichen Untersuchungsergebnissen kommen [159]. Eine möglichst homogene Zellpopulation ist Voraussetzung für eine Reproduzierbarkeit der einzelnen Versuche. Wir entschieden uns darum das Magnetic labeled Bead Cell Separation Verfahren, welches höchste Homogenität und somit Reproduzierbarkeit ermöglicht.

Bei dem obengenannten Verfahren werden monoklonale Antikörper gegen CD14-Monozytenantigen verwendet, welche an Metallkugelchen gebunden sind. In Kombination mit einem starken Magneten können so die Monozyten gezielt aus den Bestandteilen des Buffy Coats extrahiert werden. Die gewonnenen Zellen können dann durch Zugabe von GM-CSF zu Makrophagen

ausdifferenzieren.

Durchführung:

Im Vorfeld wurde die Separationssäule bei -4°C im Kühlschrank vorgekühlt und in vier 50 ml-Reaktionsgefäß je 1 ml Ficoll (Zentrifugationsmedium Ficoll-Paque Premium) vorgelegt. Dann wurde je 50 ml Buffy coat 1:2 mit PBS (10x DPBS ohne CaCl_2 ohne MgCl_2) verdünnt, 25 ml dieser Suspension vorsichtig mit einer 25 ml Pipette auf das Ficoll aufgeschichtet und bei 400 x g für 30 Minuten bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Nun wurde das der Plasmaüberstand weitestgehend abgenommen und verworfen und dann die Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMNC) vorsichtig mit einer 3 ml Pasteur-Pipette aufgenommen, gleichmäßig in zwei 50 ml Reaktionsgefäß überführt und dadurch gleichzeitig je 2 PBMNCs gepoolt. Bevor mit 300 x g für 10 Minuten bei 20°C ohne Bremse erneut zentrifugiert wurde, erfolgte ein erneutes auffüllen beiden 50 ml Reaktionsgefäß auf 50 ml. Anschließend wurden die Sedimente mithilfe einer großen 5 ml Pipette vorsichtig aufgelockert, wiederum zwei Sedimente gepoolt und die Suspension erneut mit PBS auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, dann erneut mit 200 x g für 10 Minuten bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Dieser letzte Waschschritt wurde dann noch einmal wiederholt.

Die nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt um die Zellaktivität auf einem geringen Level zu halten.

Die Überstände wurden nach dem Zentrifugieren dekantiert und das Sediment in 1 ml eiskaltem Zellkulturmedium gut resuspendiert und auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Danach wurde die Zellzahl mithilfe der Bürker-Zählkammer bestimmt.

Nun erfolgte die Zellseparation mit Hilfe des „MACS® Cell Separation Sets“. Es wurden dafür die in obengenannter Weise vorbereiteten Zellen in ein neues 50ml-Reaktionsgefäß überführt und mit MACS®-Puffer (1 x PBS + 1mM EDTA + 0,5% FBS) auf 20 ml aufgefüllt. Diese Suspension wurde dann bei 200 x g für

10 Minuten bei 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen und das Sediment in insgesamt 800 µl MACS®-Puffer resuspendiert und mit einer 100 µl Pipettenspitze gemischt bevor 200 µl der an ein Metall gebundenen monoklonalen Antikörper (Beads) dazugegeben wurden. Um ein möglichst homogenes Mischverhältnis zu erhalten wurde mit einer 100 µl Pipettenspitze drei Mal gemischt und für 15 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Dann wurden 9 ml MACS®-Puffer dazugegeben, gemischt und für 10 Minuten mit 300 x g bei 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde die vorgekühlte Säule im Magnet eingespannt und mit 3 ml MACS®-Puffer äquilibriert, d. h. es wurde 3 ml Puffer auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf verworfen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 1 ml MACS®-Puffer gut resuspendiert und auf die Säule gegeben. Danach wurde 3 Mal mit je 3 ml MACS®-Puffer nachgespült. Nachdem der MACS®-Puffer vollständig durchgelaufen ist, wurde die Säule zügig und senkrecht nach vorne vom Magneten abgenommen, um die Zellen nicht zu großem physikalischen Stress durch Scherkraftwirkung auszusetzen und auf ein 15 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Die in der Säule verbliebenen Zellen wurden nun mithilfe des Stempels zügig in das 15 ml Reaktionsgefäß gepresst und anschließend bei 200 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde danach dekantiert und das Sediment in 1 ml Zellkulturmedium (RPMI + 10% FBS + 100U/ml Penicillin + 100µl/ml Streptomycin) resuspendiert, gut gemischt und auf 10 ml aufgefüllt. Dann wurden die Zellen mit der Bürker-Zählkammer gezählt und auf die für den Versuch benötigte Zellzahl je Well eingestellt. 400 U/ml GM-CSF wurde hinzugegeben und 1 ml pro Well in die 24-Well Platte pipettiert. Beispielhaft sind einige exemplarische Gesichtsfelder bei der mikroskopischen Kontrolle der Zellentwicklung in Abbildung 7 zu sehen.

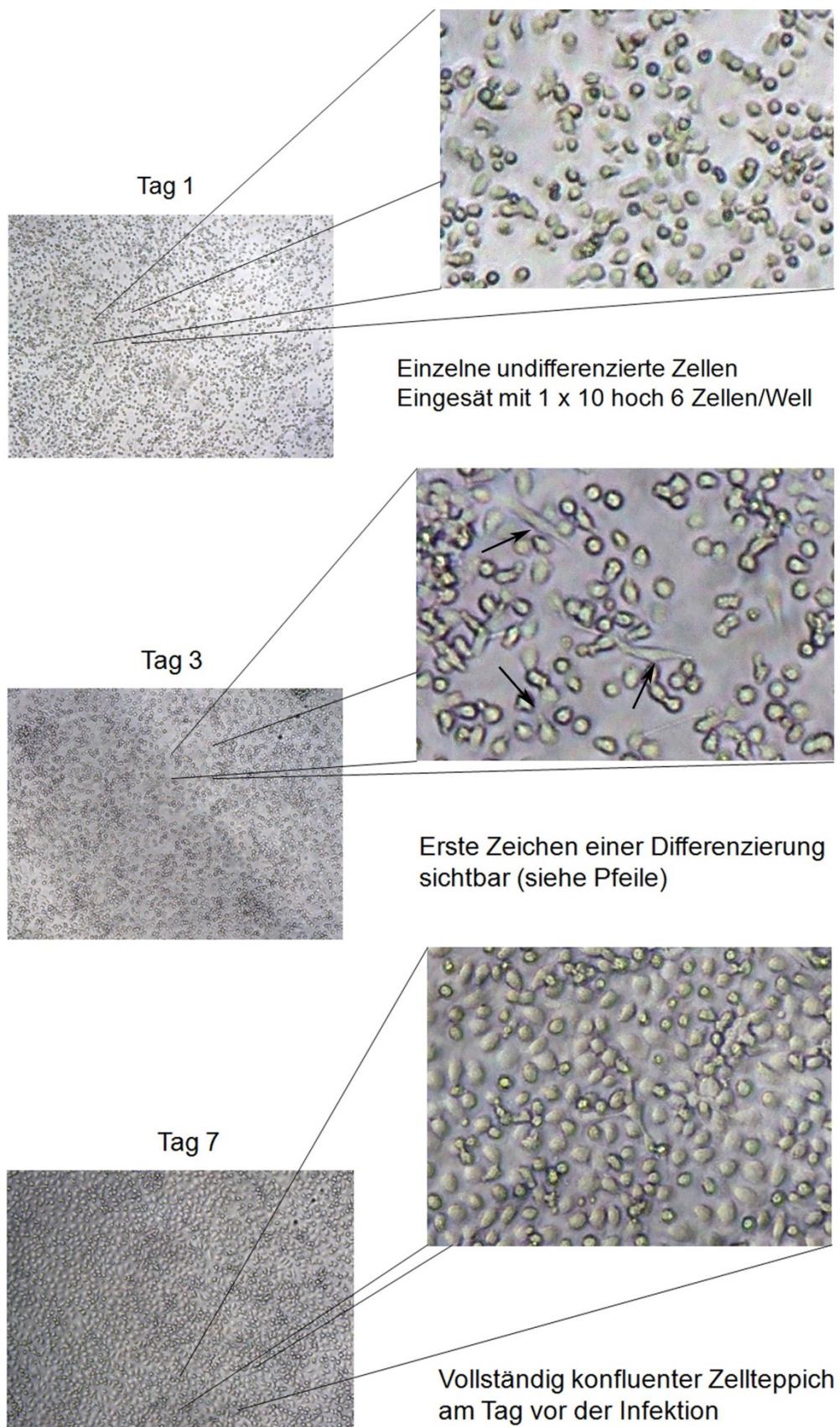


Abbildung 7: Fotos von Gesichtsfeldern im Lichtmikroskop per Digitalkamera angefertigt. Zu erkennen sind die verschiedenen Entwicklungsstadien (Tag 1, Tag 2, Tag 7 nach Isolation) der nach oben genanntem Schema eingesäten primär isolierten Makrophagen. links 100x Vergrößerung, rechts 200x Vergrößerung.

Die Zellen wurden in den 24-Well Platten bis zum Versuchstag bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte am Tag 3 und Tag 5 nach Isolation. Hierzu wurde das Medium vollständig vorsichtig abgezogen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Bis zwei Tage vor der Infektion beinhaltete das Medium Penicillin und Streptomycin zur Kontaminationsprophylaxe.

Zur Zellzahlbestimmung wurde am Infektionstag jedes Well einmal mit PBS gewaschen, dann 300 µl Accutase je Well hinzugegeben und für zwölf Minuten inkubiert. Darauf wurde die Zellen mit einem Zellkratzer mechanisch gelöst und anschließend mit je 700 µl PBS mithilfe einer 100 µl-Pipettenspitze gespült und in je ein Kochsalzröhrchen überführt. Anschließend 1:2 mit Trypanblau verdünnt und mithilfe der Bürker-Zählkammer gezählt.

Es wurde immer die Anzahl der Zellen in drei Wells bestimmt und gemittelt. Die daraus resultierenden Zellzahlen waren die Grundlage für unsere weiteren Berechnungen.

5.10 Einfärben der Zellen für Doppelimmunfluoreszenz (DIF)

Die DIF eignet sich als Methode zur Darstellung, ob sich zu einer gegebenen Zeit Bakterien auf oder in der Zelle befinden [160]. Das Grundprinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper Reaktion. In unserem Falle nutzen wir die Bindungsaffinität des Anti-*B. henselae* Antikörpers gegen das Bakterium *B. henselae*.

Praktisch wird nun das zu untersuchende Antigen mit dem spezifischen Primärantikörper in großer Überzahl zusammengebracht, wodurch möglichst viele Antigenbindungstellen besetzt werden. Die nicht gebundenen Antikörper werden abgespült. Der nun fest an das spezifische Antigen gebundene Primärantikörper wird im zweiten Schritt mit einem Sekundärantikörper detektiert, welcher wiederum sehr spezifisch für den ersten Antikörper und direkt mit einem Fluorophor konjugiert ist. Die so entstandenen Antigen-

Primärantikörper-Sekundärantikörper-Fluorophor-Komplexe können unter dem Fluoreszenzmikroskop je nach Bedarf dargestellt und ausgewertet werden.

Durchführung:

Im Vorfeld des Versuches wurden wie oben beschrieben Makrophagen isoliert und in Zellkulturkammern auf runde Deckgläser in der Konzentration 1×10^6 Zellen je Well eingesät. Zudem wurden die Bakterien nach obengenanntem Schema angezüchtet. Die Keimzahl der angereicherten Bakterien wurde im Duplikat bestimmt.

Nach Anreicherung wurden die Bakteriensuspensionen je nach der im Versuchsaufbau angestrebten MOI unterschiedlich verdünnt. Die Verdünnungen wurden beispielsweise in folgender Form erreicht: Bei einer Makrophagenzellzahl von $4,5 \times 10^5$ Zellen/ml/Well, einer Keimzahl von $4,5 \times 10^8$ KBE/ml und einer angestrebten MOI von 100 war eine 1:12 Verdünnung nötig, d.h. es wurden 0,5 ml Bakteriensuspension mit 4,5 ml Zellkulturmedium (RPMI + 10% FBS) gemischt. Von dieser nun erhaltenen Suspension wurde dann jeweils 1 ml je Well pipettiert. Die infizierten Zellkulturkammern wurden 10 Minuten bei $754 \times g$ und $22^\circ C$ zentrifugiert und danach für 2 Stunden bei $37^\circ C$ und 5% CO_2 inkubiert.

Im Anschluss wurde mit je 1 ml PBS je Well zweimal gewaschen, und nach Absaugung des PBS zur Fixierung der infizierten Zellen jeweils 300 μl auf $4^\circ C$ gekühltes 4% Paraformaldehyd Well hinzugegeben und für 15 min bei $4^\circ C$ in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde wieder drei Mal wie oben gewaschen.

Für die extrazelluläre Färbung (grün) wurden 10 μl des anti-*Bartonella henselae* Primärantikörpers (Kaninchen) in 10 ml PBS (Verdünnung 1:1000) gegeben und sorgfältig gevortext und davon jeweils 300 μl je Well gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur bei 50 rpm auf dem Rüttler inkubiert. Danach wurde drei Mal mit 1 ml PBS je Well gewaschen und mit dem je 1ml Blockmedium (1% FBS in 1 x PBS) pro Well die freien Bindungsstellen geblockt. Es schloss sich

eine Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit 50 rpm an. Ab diesem Zeitpunkt wurde im Dunkeln gearbeitet um den Energieverlust der Fluorophore möglichst gering zu halten. 10 µl des mit einem grünen Fluorophor konjugierten Sekundärantikörpers gegen Kaninchen wurden in 5 ml PBS (Verdünnung 1:500) verdünnt, sorgfältig gevortext und von dieser jeweils 300 µl je Well hinzugegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit 1 ml PBS je Well gewaschen.

Für die intrazelluläre Färbung (rot) wurde erst die Zellmembran durch Zugabe von 300 µl 0,1 % Triton-X-100 je Well permeabilisiert, anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer bei 50 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Nun erfolgte nach 1:1000 Verdünnung in PBS die Zugabe von 300 µl je Well des intrazellulären anti-Bartonella henselae Primärantikörpers (Kaninchen). Erneute Inkubation für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 50 rpm auf dem Rüttler. Anschließend wurde drei Mal mit 1 ml PBS je Well gewaschen. Nun Blocken der noch freien Bindungsstellen durch Zugabe von 1 ml je Well des Blockmediums. Ab diesem Zeitpunkt wurde erneut im Dunkeln gearbeitet. In der Folge wurde der mit einem roten Fluorophor konjugierten Sekundärantikörper gegen Kaninchen 1:500 in PBS verdünnt, 300µl je Well gegeben und für 10min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Es erfolgten drei erneute Waschvorgänge mit 1ml PBS je Well und eine dreißig Sekunden andauernde Lufttrocknung. Abschließend wurden die Deckgläser einzeln vorsichtig mit Eideckmedium (Mounting Medium) eingedeckt, mit handelsüblichen Nagellack versiegelt und bis zur Auswertung bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

5.10.1 Quantitative Auswertung des Infektionsgrades mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie

Die nach obigem Schema vorbereiteten und verarbeiteten Bakterien und Zellen wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskop ausgezählt. Dabei wurden bei einer 600-fachen Vergrößerung (Objektiv 60x, Okular 10x), bei jeweils zwei Objektträgern je Infektion und MOI, auf diesen jeweils 3 exemplarische Gesichtsfelder ausgewählt und die sicher sichtbar Infizierten Zellen ausgezählt.

5.11 Durchführung der Elektronenmikroskopie von infizierten und nicht infizierten Makrophagen

Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung sollte geprüft werden, ob sich *B. henselae* nach der Infektion von primären humanen Makrophagen intrazellulär nachweisen lässt und in welchem Kompartiment sich die Bakterien vermehrt befinden.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert, eingesät und mit MOI 10 infiziert. Nach der Infektion wurde 10 Minuten bei 754 g und 22°C, ab 200 rpm (8 x g) ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde für 2 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und nachfolgend zwei Mal mit PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen durch Zugabe von 300 µl Fixationslösung (5% Formaldehyd in Natriumphosphatpuffer) je Well und einer Stunde Inkubation fixiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellkratzer gelöst und mittels 100 µl Pipettenspitze in ein 15 ml Reaktionsgefäß gepoolt, auf 10 ml mit PBS aufgefüllt und für 10 Minuten bei 22°C und 300 x g zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde nochmal wiederholt. Abschließend wurden die Zellen in Aceton dehydriert und in Einbettungsmedium (Spurr resin) fixiert. Mit Glasmessern wurden Ultradünnschnitte angefertigt und diese im Elektronenmikroskop durchgemustert.

5.12 Statistik

Die statistischen Signifikanzen wurden mithilfe des Programmes Word Excel 2007 in Form eines 2-seitigen, gepaarten t-Tests errechnet. Vergleiche zwischen zwei Versuchsgruppen wurden als statistisch signifikant angesehen bei p < 0,05.

6 Ergebnisse

6.1 Adhärenz, Internalisierung und Persistenz von *Bartonella* B1-SK1 und B1-SK50 in THP-1 Zellen

Um zu überprüfen, ob wiederholte die Passagen von Bartonellen dessen Virulenz beeinflusst Infizierten wir die THP-1 Zellen mit *B. henselae* vor und nach fünfzig in vitro-Passagen und verglichen seine Fähigkeiten der Adhärenz, Internalisierung und Persistenz zu verschiedenen Zeitpunkten.

Es zeigte sich, wie in Abbildung 8 zu sehen, dass die 50-fach passagierten Bakterien (B1-SK50) sich bei der Adhärenz und Internalisierung annähernd gleich wie die nicht passagierten Bakterien (B1-SK1) verhalten. Bei der Persistenz, ab einer Inkubationszeit von 48 Stunden, überleben B1-SK50 jedoch signifikant ($p = 0.002$) schlechter intrazellulär.

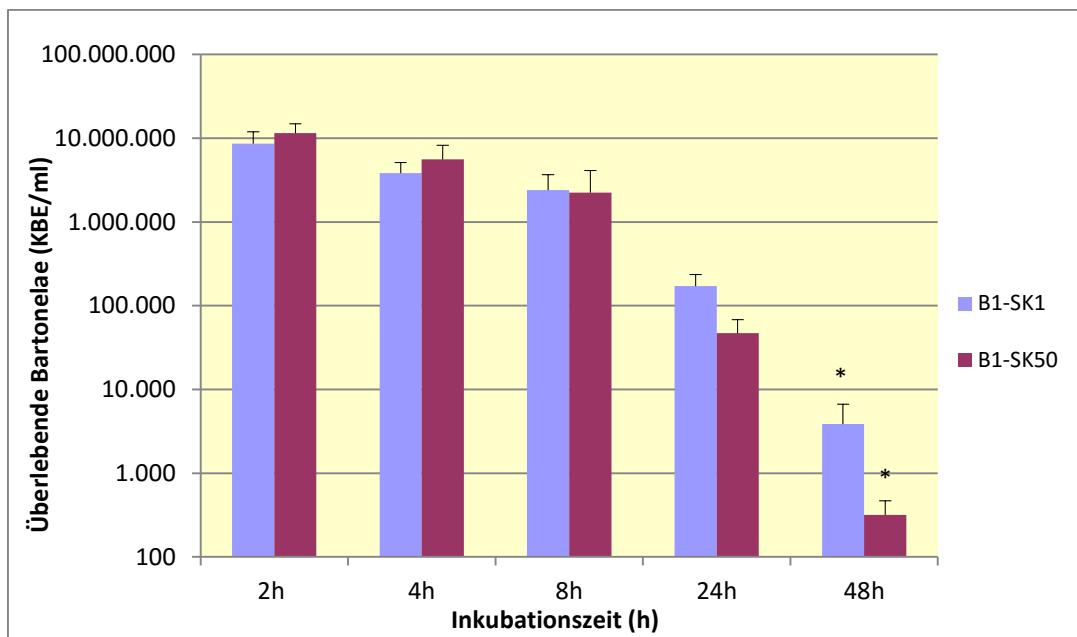


Abbildung 8: Kinetik und Vergleich der *Bartonella* B1-SK1 und B1-SK50. Adhärenz (2h) Internalisierung (4h) und Persistenz ($\geq 8h$) in THP-1. MOI 100 und Infektion für den angezeigten Zeitraum. Die Standardabweichung, dargestellt durch die Fehlerbalken, wurde über den Mittelwert von sechs repräsentativen Versuchen errechnet. Die statistisch signifikanten Daten sind mit * markiert.

6.2 Die Infektion von THP-1 Makrophagen und primären humanen Makrophagen mit *Bartonella henselae* induziert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen.

Um festzustellen, inwiefern die *B. henselae* Infektion die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen auslösen kann, und ob sich durch die Passage der Bakterien ein Unterschied in der Zytokinantwort zeigt, wurden THP-1 Zellen und primäre humanen Makrophagen (PHM) mit Bakterien vor und nach ihrer Passage infiziert und die Überstände nach verschiedenen Zeitpunkten mittels ELISA auf das Zytokin TNF- α hin untersucht. Zudem wurde mittels Vergleich der Zytokinantwort auf vitale und hitzeinaktivierte Bakterien untersucht, ob dessen Auslösung einer aktiven Handlung seitens des Bakteriums bedarf. Reines Zellkulturmedium und Zellkulturmedium mit LPS (1 μ g/ml) dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle.

6.2.1 Ausschüttung von TNF- α durch THP-1 Makrophagen bei Infektion mit verschiedenen Passagen von *B. henselae*

Bei der Infektion von THP-1 Makrophagen mit *Bartonella* B1-SK1 und B1-SK50 konnte, wie auch in Abbildung 9 zu sehen, festgestellt werden, dass die TNF- α Produktion gegenüber der Positivkontrolle LPS signifikant ($p = 0,02$) geringer ausfällt. Die beiden Bartonellenkulturen unterschieden sich nicht hinsichtlich Auslösung der TNF- α Sekretion bei den THP-1 Makrophagen ($p = 0,21$).

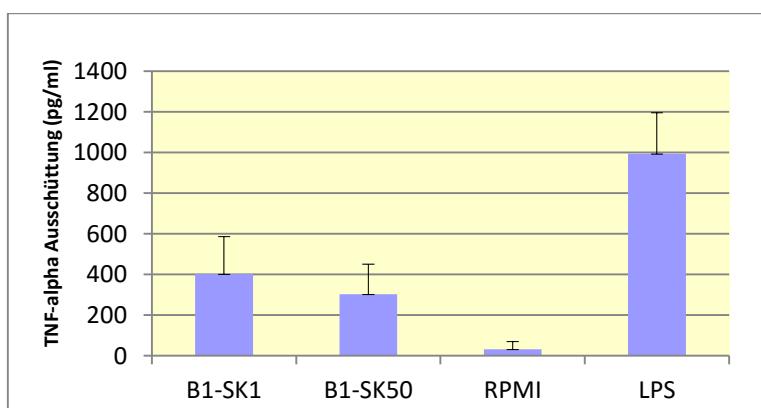


Abbildung 9: TNF- α Ausschüttung von THP-1 Zellen 24h nach Infektion mit *Bartonella* B1-SK1 (MOI MW 34) und B1-SK50 (MOI MW 42). Als Negativkontrolle wurde reines Zellkulturmedium (RPMI) verwendet, als Positivkontrolle LPS (1 μ g/ml). Die abgebildeten Daten repräsentieren den Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweiliger 3-facher Wertermittlung.

6.2.2 Ausschüttung von TNF- α durch THP-1 Makrophagen bei Infektion mit vitalen und hitzeinaktivierten *B. henselae*

Bei der Infektion von Makrophagen der Zelllinie THP-1 mit vitalen *Bartonella* B1-SK1 und hitzegetöteten *Bartonella* B1-SK1 im Vergleich zur Positivkontrolle LPS und zur Negativkontrolle mit reinem Zellkulturmedium (RPMI) konnten wir, wie auch in Abbildung 10 dargestellt, feststellen, dass sowohl nach 24 Stunden als auch nach 5 Stunden die vitalen ($p < 0,01$) und die inaktivierten Zellen ($p < 0,01$) unabhängig von ihrer MOI eine signifikant niedrigere Zellreaktion auslösten als die Positivkontrolle. Ein signifikanter Unterschied in der Zellantwort zwischen den vitalen und den hitzeinaktivierten Bakterien konnte nicht festgestellt werden. Jedoch zeigte sich wie in späteren Versuchen noch differenzierter dargestellt eine signifikant ausgeprägte Zellantwort bei den höheren MOIs.

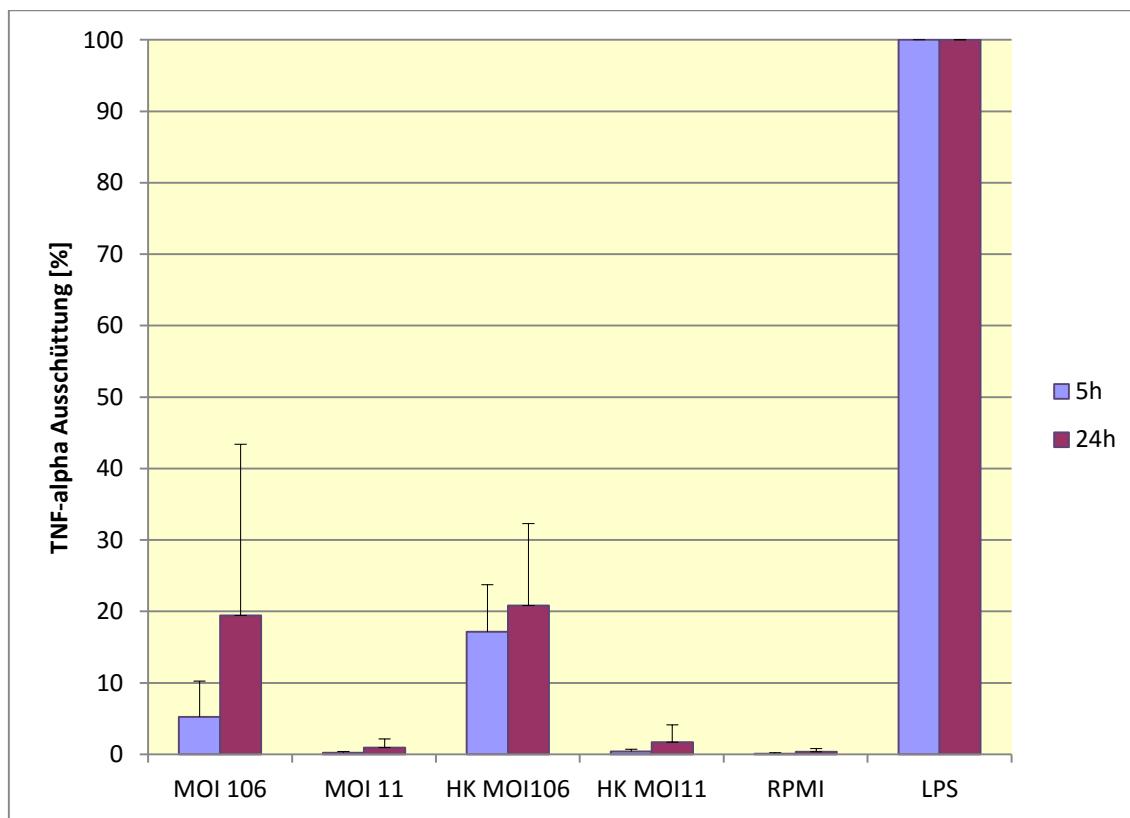


Abbildung 10: Vergleich von vitalen und hitzegetöteten (HK) *Bartonella* B1-SK1 in jeweils angegebener MOI bei Infektion von THP-1 Zellen. Inkubation für 5h und 24h, dann Abnahme des Überstands und Bestimmung der TNF- α Konzentration mittels ELISA. Als Negativkontrolle wurde reines Zellkulturmedium (RPMI) verwendet, als Positivkontrolle LPS (1 μ g/ml). Die abgebildeten Daten repräsentieren den Mittelwert mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweiliger 3-facher Wertermittlung.

6.2.3 Ausschüttung von TNF- α durch primäre humane Makrophagen bei Infektion mit *B. henselae* in verschiedener Konzentration.

Wie in Abbildung 11 zu sehen, konnte gezeigt werden, dass die Infektion von PHM mit Bartonella B1-SK1 mit unterschiedlicher Bakterienanzahl pro Zelle (MOI) zur Ausschüttung von TNF- α führte und dass diese Reaktion dosisabhängig ist. Die höchste Konzentration wurde durch eine MOI von 100 erreicht.

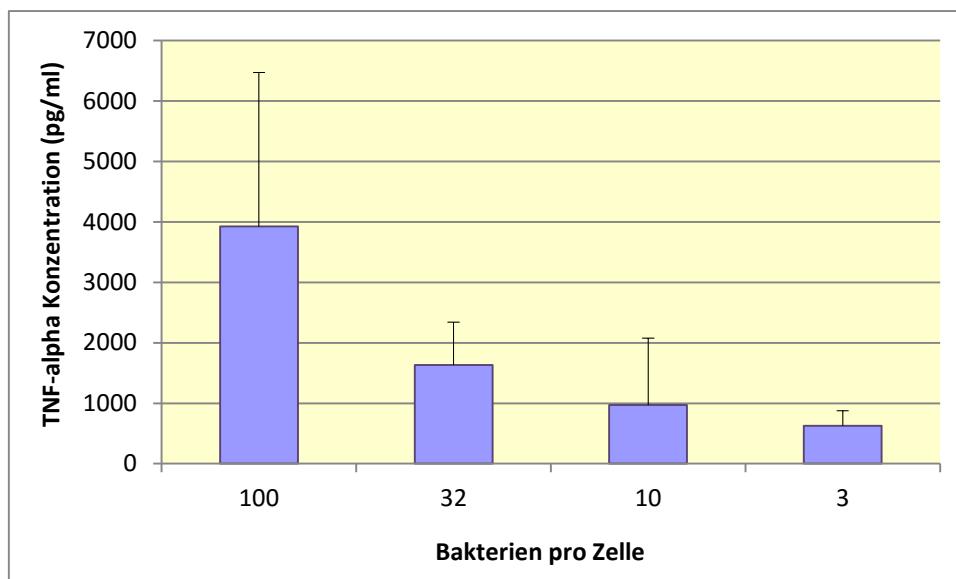


Abbildung 11: PHM infiziert mit verschiedenen MOIs von Bartonella B1-SK1; nach 5h Inkubation wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA die TNF- α Ausschüttung im Überstand als Zeichen einer Zellreaktion gemessen. Die abgebildeten Daten repräsentieren den Mittelwert mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweiliger 3-facher Wertermittlung.

6.3 Doppelimmunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von gebundenen und intrazellulären *B. henselae* in THP-1 Zellen und primären humanen Makrophagen

Die Zellen, wie in Abbildung 12 zu sehen, wurden für 2 Stunden infiziert und anschließend wie oben beschrieben angefärbt, konserviert und mittels Immunfluoreszenzmikroskop aufgenommen. Es zeigten sich hier deutlich abgrenzbar, die einzelnen sich durch ihren blau angefärbten Zellkern auszeichnenden Zellen, die rot gefärbten intrazellulär sowie die grün angefärbten extrazellulär befindlichen, teils adhärierten Bakterien in unterschiedlicher Anzahl pro Zelle und Vergrößerung.

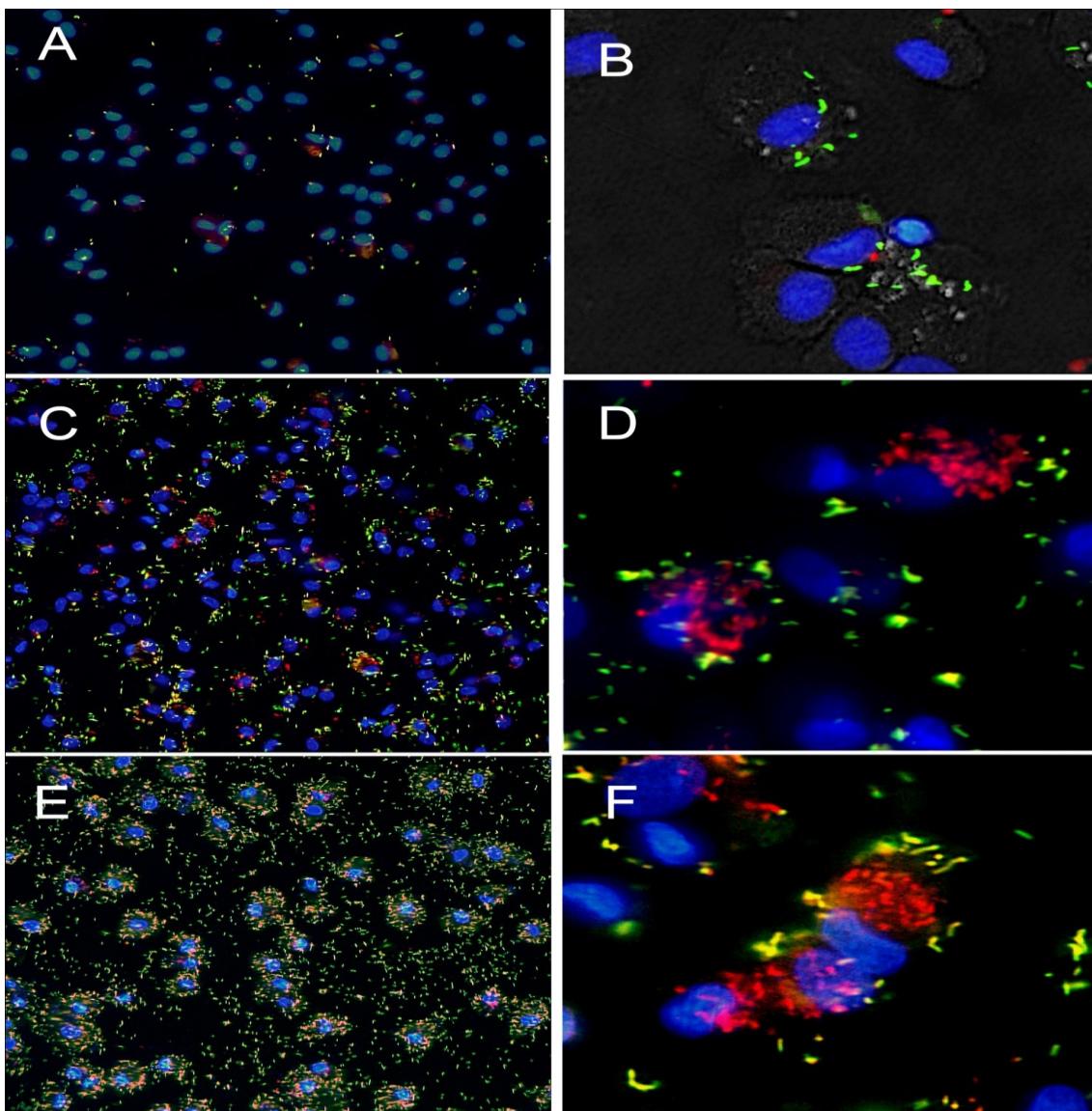


Abbildung 12: DIF-Bilder von *Bartonella* B1-SK1 2h nach Infektion von Primären humanen Makrophagen. MOI1, 200-fache Vergrößerung (A), MOI1, 600-fache Vergrößerung (B). MOI10, 200-fache Vergrößerung (C), MOI10, 600-fache Vergrößerung (D). MOI100, 200-fache Vergrößerung, MOI100, 600-fache Vergrößerung (E).

6.3.1 Mikroskopische Bestimmung des Infektionsgrades der primären humanen Makrophagen nach Infektion mit *B. henselae* in unterschiedlicher Bakterienanzahl pro Zelle.

Die Infizierten Zellen wurden in oben beschriebener Weise angefärbt und konserviert und mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie ausgezählt. Es zeigte sich, wie in Abbildung 13 zu sehen, dass schon bei 4 Bakterien pro Zelle, über 90 Prozent der Zellen infiziert waren. Es ist beachtlich, dass bereits eine sehr geringe MOI (eine Bakterie pro Zelle) eine Infektion von 20% der Zellen hervorrufen kann.

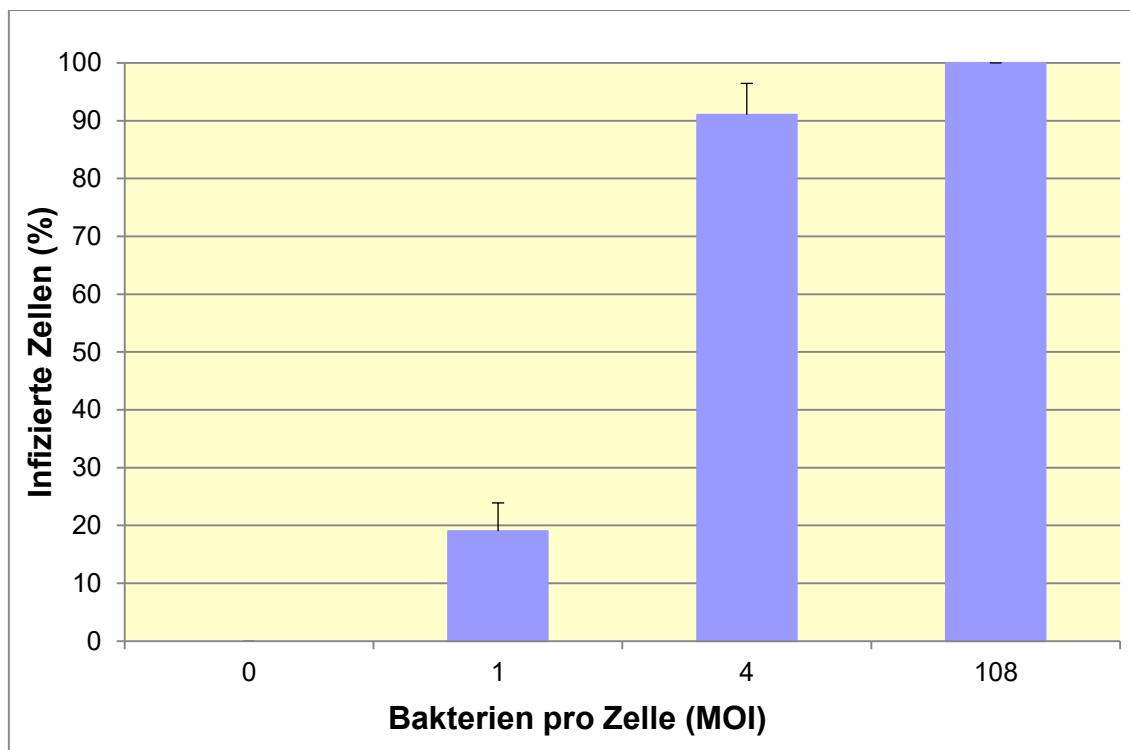


Abbildung 13: Diagramm 2h nach Infektion von primären humanen Makrophagen mit *B. henselae* in unterschiedlicher MOI. Drei Gesichtsfelder pro Versuch wurden von je zwei Infektionen ausgezählt, die Zahlen wurden von drei repräsentativen Versuchen gemittelt. Es zeigt den Prozentsatz der infizierten Zellen im Verhältnis zu der Anzahl der Bakterien pro Zelle.

6.4 Elektronenmikroskopische Darstellung der gebundenen und intrazellulären *B. henselae* in primären humanen Makrophagen

Die primären humanen Makrophagen wurden in oben beschriebener Weise infiziert und für die elektronenmikroskopische Untersuchung konserviert.

In den Abbildungen 14 – 16 zeigen sich nun die PHM vor und nach Infektion mit *B. henselae* in verschiedenen Vergrößerungen (siehe auch die jeweilige Größenskala rechte untere Bildecke).

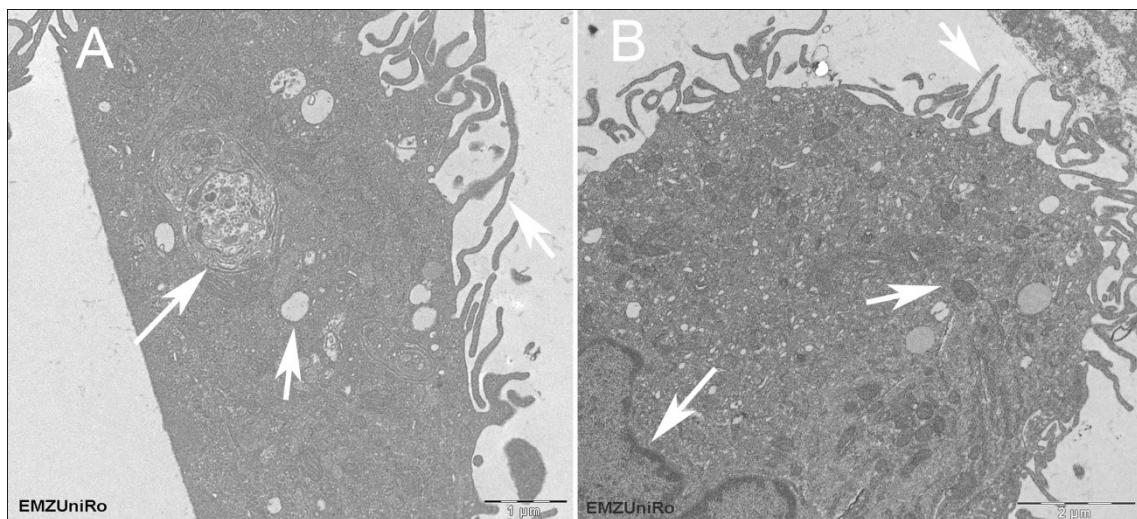


Abbildung 14: Nicht Infizierte PHM. Es sind die typischen Zellorganellen sowie die charakteristischen Pili deutlich erkennbar (Pfeile).

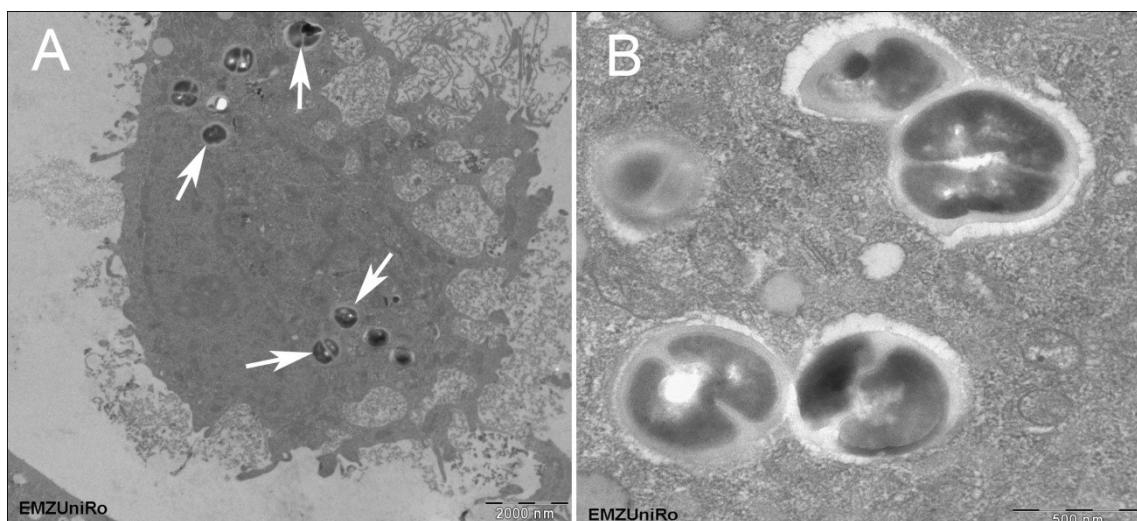


Abbildung 15: Infizierten Zellen. Die Bakterien sind deutlich durch ihre charakteristische Form von den Zellorganellen abzugrenzen. In der vergrößerten Aufnahmen (B) sind Bakterien in intrazellulärer Lage zu erkennen (D).

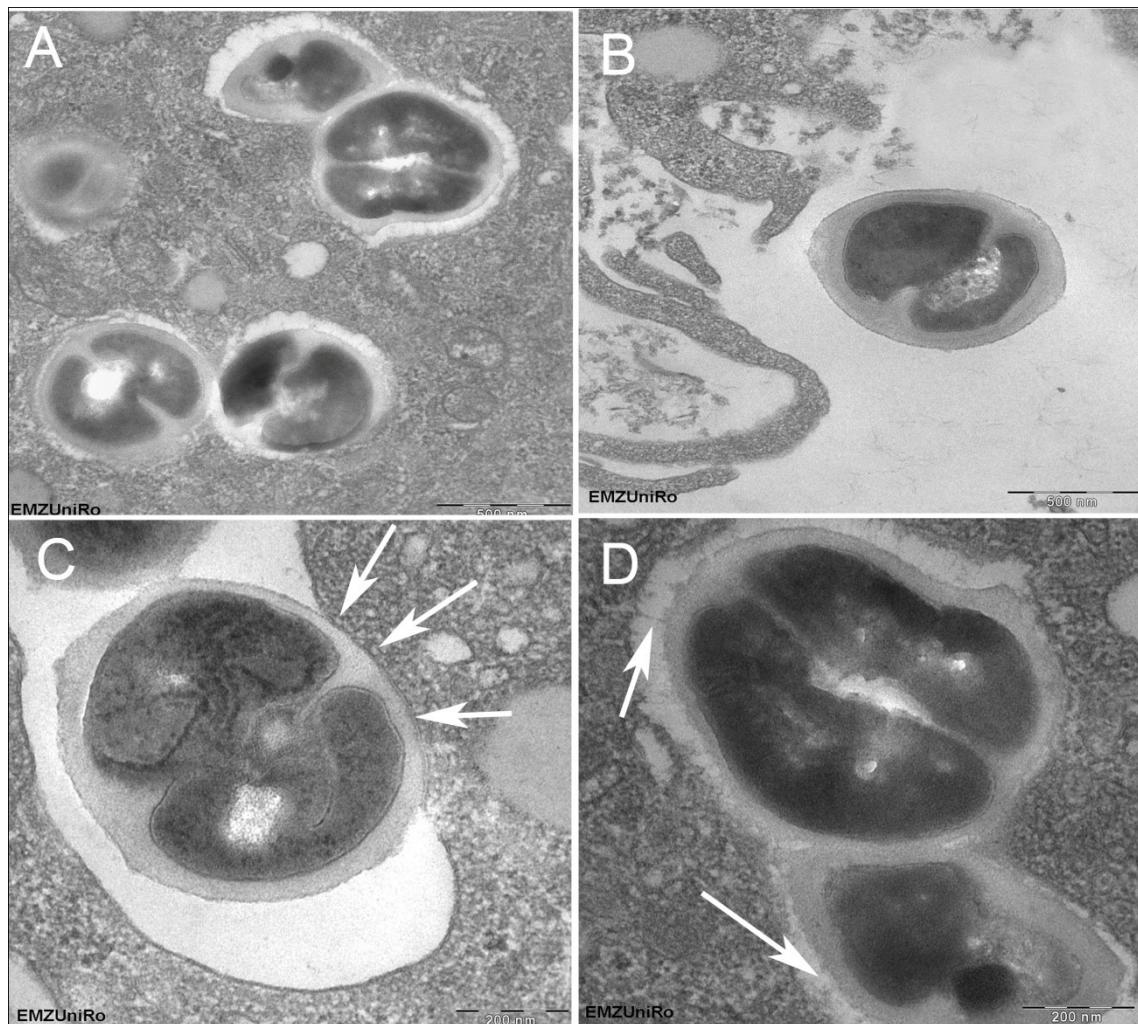


Abbildung 16: Infizierte Zellen. Es zeigen sich sowohl Bakterien in intrazellulärer Lage (A), als auch Zellen, die im Begriff der Zellinvasion sind (C). Außerdem Zellen, welche umgeben von der charakteristischen Struktur des Makrophagen, deutlich extrazellulär liegen (B). In (D) sind piliartige Strukturen zwischen der Bakterienzellwand und dem Makrophagen zu erkennen (weiße Pfeile).

6.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Die nicht passagierten *B. henselae* B1-SK1 persistieren in THP-1 Makrophagen nach 48 Stunden signifikant besser als die 50-fach passagierten Bakterien B1-SK50.
- B1-SK1, B1-SK50 und hitzeinaktivierten *B. henselae* verursachen bei Infektion von THP-1 Makrophagen im Vergleich keine signifikant unterschiedliche Zytokinantwort.
- Vitale *B. henselae* in verschiedener Passage und hitzegetötete Bakterien verursachen bei Infektion von THP-1 Makrophagen eine signifikant niedrigere Zytokinantwort als die Positivkontrolle LPS.
- Auch bei der Infektion von primären humanen Makrophagen mit *B. henselae* ist die Zytokinantwort selbst bei hohen MOIs (101 Keime pro Zelle) signifikant niedriger als bei der Positivkontrolle LPS.
- DIF: Bei Infektion von THP-1 Makrophagen mit *B. henselae* werden schon bei niedrigen MOIs (4 Keime pro Zelle) über 90 Prozent der Zellen infiziert
- Elektronenmikroskopie: Bei der Infektion von primären humanen Makrophagen mit *B. henselae* sind die Bakterien nach 5 Stunden deutlich intrazellulär und scheinen sich zu teilen.

7 Diskussion

7.1 Die Infektion von THP-1 Makrophagen und primären humanen Makrophagen mit *B. henselae* induziert die Produktion von TNF- α .

Bakterien der Gattung *Bartonella* sind bekannt als Verursacher verschiedener humaner Erkrankungen, wie z. B. die Katzenkratzkrankheit oder auch das Fünf-Tage Fieber. Insbesondere bei Patienten mit verminderter eigener Immunabwehr tritt eine Infektion klinisch besonders stark in Form der vaskuloproliferativen Erkrankungen auf und kann erhebliche gesundheitliche Probleme mit sich bringen. Die genauen Hintergründe, die diese Potenzierung der Heftigkeit der Erkrankung mit sich bringen, sind noch unzureichend untersucht. Im Fokus unserer Untersuchung standen die Makrophagen als wichtiger Bestandteil der zellulären Immunabwehr.

Es ist bekannt, dass die Interaktion zwischen mononukleären phagozitierenden Zellen und Bakterien einen veränderten funktionellen Zustand der Zellen zur Folge haben kann, welcher zur Ausschüttung von proinflammatorischen, antimikrobiellen oder angiogenetischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren mit autokrinen und parakrinen Funktionen führt. Als Folge dieser direkten Interaktion der Keime mit den Makrophagen ist TNF- α eines der ersten Zytokine welches ausgeschüttet wird. Die TNF- α Ausschüttung als Reaktion von Makrophagen auf bakterielle Erreger ist gut dokumentiert [161] [162] [163]. Der Faktor spielt eine zentrale Rolle bei der Abwehr eines infizierten Wirts gegen einen fremden Organismus. Üblicherweise sorgen die Interaktionen von Makrophagen mit gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli* oder auch *Borellia burgdorferi* [164] für eine Ausschüttung von TNF- α . Im Tiermodell wurde nach Infektion mit gram-negativen Bakterien und Proliferation der Keime in der Blutbahn, TNF- α als einer der Hauptfaktoren für die Ausbildung eines septischen Schockes erachtet [165]. Erste Hinweise auf den besonderen Wirkmechanismus von *B. henselae* ergaben die Beobachtungen, dass selbst die direkte intravenöse Injektion von *B. henselae* in Mäuse, keinen letalen

septischen Schock zur Folge hat, der eigentlich bei einer so massiven Infektion mit gram-negativen Bakterien zu erwarten wäre. Stattdessen wurden die Keime schnell aus der Blutbahn entfernt [166] [167]. Beim Menschen hingegen ist zwar als Folge der TNF- α -Ausschüttung eine klinische Reaktion bemerkbar, jedoch weit weniger ausgeprägt. Im Verlauf einer HIV-Infektion wird von einer anfänglichen Aktivierung der Makrophagen durch extrazelluläre Pathogene die Funktion der Makrophagen immer weiter eingeschränkt, so dass die Aktivierung im späteren Verlauf nicht mehr möglich ist [168].

Es konnte zudem gezeigt werden, dass es bei einigen Patienten während des klinischen Einsatzes von verschiedenen TNF- α neutralisierenden Antikörpern, wie Infliximab oder Etanercept zu fulminanten Exazerbationen von Tuberkulose, Listeriose und anderen granulomatösen Erkrankungen kam [169] [170] [171]. Diese Beobachtungen unterstreichen die Wichtigkeit von TNF- α .

Ein wichtiges Merkmal des Pathogens zur Erkennung und Verarbeitung durch Makrophagen sind inkorporierte LPS. Diese LPS sind Hauptbestandteil der äußeren Bakterienmembran von gram-negativen Bakterien. Die LPS von gram-negativen enterischen Bakterien wie *Escherichia coli* oder *Salmonella enterica* sind in der Lage, die Produktion und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen zu induzieren und somit die klinischen Zeichen einer Sepsis zu erzeugen [172]. Aufgrund der starken proinflammatorischen Effekte der meisten Bakterien, welche LPS in ihrer Oberflächenmembran besitzen, ist die Tatsache, dass Patienten mit einer *Bartonella quintana* Bakterämie keine klinischen Zeichen einer Sepsis entwickeln, ein ungeklärter Aspekt dieser Infektion. Es wurde in diesem Zusammenhang die Überproduktion des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 (IL-10) festgestellt. Dieses Phänomen und eine in der Folge insgesamt abgeschwächte inflammatorische Reaktion lieferte eine mögliche Erklärung (5).

In unserer Arbeit konnte nun festgestellt werden, dass die *B. henselae* Bakterien nach Infektion schnell an die Zellen adhärieren und internalisiert

werden und dort intrazellulär für einige Zeit überleben. Dieser Vorgang hat jedoch auch bei sehr hohen MOIs, im Gegensatz zur Positivkontrolle LPS, eine im Verhältnis sehr niedrige TNF- α Ausschüttung zur Folge. Diese Beobachtung konnte sowohl bei der Makrophagenzelllinie THP-1 als auch bei den primären humanen Makrophagen festgestellt werden. Genauere Untersuchungen zeigten, dass die Reaktion dosisabhängig ist.

Interessanterweise konnte im scheinbaren Gegensatz zu unseren Ergebnissen durch Musso et al [173] gezeigt werden, dass *B. henselae* bei Infektion von der murinen Makrophagenzelllinie J774 eine signifikant höhere TNF- α Ausschüttung gegenüber der Stimulation mit LPS (identische Dosierung wie in unseren Versuchen) zur Folge hatte und das auch hier die Ausschüttung dosisabhängig war.

In einer Arbeit von Telepnev et al [174] konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl bei Infektion von humanen Makrophagen, als auch bei der murinen Makrophagenzelllinie J774 mit dem auch fakultativ intrazellulär lebenden Bakterium *Francisella tularensis*, nach einer initialen starken inflammatorischen Antwort, diese Inflammation aber im weiteren Verlauf durch dieselben Erreger stark inhibiert wird. Der Grad der Inhibition hängt dabei davon ab, ob die Zellen von Mäusen oder vom Menschen stammen.

Bei Versuchen von Matera et al [175] mit LPS von *Bartonella quintana*, welches dem von *B. henselae* sehr ähnlich ist, konnte gezeigt werden, dass bei Injektion von aufgereinigtem LPS sowohl in Ratten als auch in Menschen, zwar ein Anstieg von IL-8 (bei den Ratten GRO-CINC-1), jedoch keine Anstieg von TNF- α festgestellt werden konnte. Aufgereinigtes LPS von *Salomonella minnesota* R595 hingegen sorgte für einen deutlichen Anstieg des TNF- α Blutspiegels.

Durch Caron et al [176] konnte hingegen gezeigt werden, dass bei Infektion der humanen Makrophagenzelllinie U937 mit der *Bartonella* phylogenetisch sehr nahe stehenden *Brucella* spp. keine signifikante Ausschüttung von TNF- α festzustellen war, wohingegen hitzegetötete Bakterien eine Reaktion zur Folge

hatten. Außerdem konnte auch hier gezeigt werden, dass *Brucella spp.* sich sowohl replizierte, als auch intrazellulär überlebte. Im Gegensatz zum nicht-pathogenen *Escherichia coli* K-12, welcher innerhalb von drei Tagen nach Phagozytose getötet wurde. Im Rahmen der Versuche der Arbeitsgruppe konnte festgestellt werden, dass eine Behandlung von Zellen der Makrophagenzelllinie U937 mit Pentoxyfylline, welches einen potenzen Inhibitor der endogenen TNF- α Produktion darstellt, ein signifikantes intrazelluläres Überleben von *Escherichia coli* zur Folge hatte, einem ebenfalls gramnegativem Stäbchenbakterium. Daraus lässt sich folgern, dass jede Unterdrückung der TNF- α Produktion, nachdem der Keim in die Zelle eingedrungen ist, einen Überlebensvorteil des fakultativ intrazellulären Bakteriums darstellt.

Zusammenfassend zeigen die genannten Ergebnisse einerseits die Individualität und Unterschiedlichkeit der einzelnen Bakterienstrategien im Zusammenhang mit der Infektion des Wirtes, andererseits lässt sich jedoch eine deutliche Gemeinsamkeit feststellen, nämlich die Fähigkeit zur Modulation der Zytokinantwort und damit eine Störung der interzellulären Kommunikation.

Die obengenannte durch Musso et al [173] gezeigte deutliche und dosisabhängige Ausschüttung von TNF- α bei Infektion von murinen Makrophagen, die deutlich verminderte Ausschüttung von TNF- α bei Infektion mit *Francisella tularensis* und die fehlende Ausschüttung von TNF- α bei Infektion einer humanen Zelllinie durch *Brucella spp.* lassen vermuten, dass unterschiedliche Mechanismen oder auch unterschiedliche Spezialisierungsgrade bei den Erregern vorhanden sind. *Brucella abortus* beispielsweise verfolgt eine Strategie, die auf dem Fehlen, der Modifikation und Verschleierung von PAMP-beinhaltenden Molekülen hinter einer festen äußeren Membran basiert [177]. Einen ähnlichen Weg könnte der nahe Verwandte *B. henselae* auch gehen. Zudem könnte es möglich sein, dass *B. henselae* beim zwar häufig infizierten aber immer noch als Fehl- bzw. Zufallswirt geltenden Wirt Mensch, die Unterdrückung der proinflammatorischen Reaktion schon weiter optimiert hat als bei der Maus. Die von *B. henselae* benutzen Mechanismen scheinen bei den Mäusemakrophagen nicht suffizient zu funktionieren.

Es gibt viele Beispiele, die zeigen, dass intrazelluläre Organismen Mechanismen entwickelt haben, die intrazellulären Signalwege der monozytären Zellen zu ihrem Vorteil zu stören. Bei *Toxoplasma gondii* folgt bei der Infektion von murinen Makrophagen beispielsweise auf eine anfängliche Aktivierung verschiedener intrazellulär regulativ wirkender Transkriptionsfaktoren wie p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK), Extrazellulär regulierte Kinase (ERK) und c-Jun amino-terminale Kinase (JNK) eine schnelle Deaktivierung derselben. Als Folge dieser Deaktivierung sind die Zellen durch LPS nicht mehr stimulierbar [178]. Yersinien können durch bestimmte Mechanismen nicht nur die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und MAPK deaktivieren [179], sondern zusätzlich durch die Spaltung bestimmter ubiquitin-ähnlicher Moleküle die posttranskriptionale Modifikation einiger regulatorischer Proteine verhindern [180]. Auch bei Infektion von Makrophagen mit anderen intrazellulären Pathogenen, wie *Mycobakterium tuberculosis*, *Leishmania major* und *Histoplasma capsulatum* konnte eine Inhibition von Zytokinen, in diesem Falle IL-12 festgestellt werden [181] [182]. Diese und andere Beispiele zeigen, dass hochspezialisierte intrazelluläre Signalkaskaden wie beispielsweise die der MAPK oder NF- κ B ein idealer Angriffspunkt für Mikroorganismen sind, die antimikrobiellen Mechanismen zu unterminieren. Diese Untersuchungen zeigen, dass Organismen im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt haben, die es ihnen ermöglicht, in Makrophagen zu überleben.

Es wird spekuliert, ob die Produktion und Sekretion von angiogenetischen Faktoren bei immunkompetenten und immunsupprimierten Individuen unterschiedlich reguliert wird. Im Rahmen von HIV-Infektionen ist die volle funktionelle Bandbreite der Monozyten und Makrophagen, welche in diesem Zusammenhang primäres Ziel dieser Infektionen und gleichzeitiges virales Reservoir darstellen, stark beeinträchtigt. So ist sowohl die Fähigkeit zur Phagozytose vermindert als auch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen im Rahmen einer Infektion erhöht [183] [184]. Aktivierte Makrophagen können zwar beispielsweise während einer HIV-Erkrankung Infektionen mit

Candida albicans oder *Toxoplasma gondii* kontrollieren, das intrazelluläre Töten dieser Keime ist aber stark eingeschränkt [185] [186].

Es stellt sich die Frage, ob durch die Infektion mit Bartonella die Funktion der Makrophagen ähnlich beeinträchtigt ist und die eingeschränkten Funktionen genauso die intrazellulären wie die interzellulären Mechanismen beeinflussen.

7.2 Internalisierung und Persistenz von *Bartonella B1-SK1* und *B1-SK50* in THP-1 Zellen.

Ein normal funktionierender Körper von Mensch und Tier ist, mit Ausnahme einiger von der mikrobiellen Normalflora besiedelter Bereiche, keimfrei. Wenn in diesen keimfreien Bereich nun ein Fremdkörper eindringt, wird dieser in der Regel schnell von den patrouillierenden Zellen des MPS aufgenommen und verdaut. Makrophagen im speziellen nehmen den Fremdkörper üblicherweise in sich auf. Dies geschieht indem sie unter Aktinpolymerisierung mithilfe der zelleigenen Membran den Fremdkörper umhüllen, mit dem komplett umhüllten Fremdkörper dann lokal fusionieren und ihn in das Zytoplasma entlassen. Auf diese Weise wird ein neues Zellorganell geschaffen, das Phagosom. Anschließend fusioniert im Rahmen der Phagosomenreifung dieses Phagosom in der Regel schnell mit einem Lysosom und bildet somit ein Phagolysosom, in dem der inkorporierte Fremdorganismus getötet und abgebaut wird [187] [188]. Das Lysosom stellt dabei eine mobile Einheit zur Bereitstellung einer Mischung von verschiedenen hydrolisierenden Enzymen dar. Dazu gehören Proteasen, Nukleaseen und Lipasen, welche in ihrer Gesamtheit nahezu jeden im Phagosom eingeschlossenen Fremdkörper abbauen können [189]. Ein besonderer Aspekt von intrazellulären Bakterien ist ihre Fähigkeit, sich dem normalerweise tödlichen vektoriellen Transport zum Lysosom zu entziehen. Dabei wird von den unterschiedlichen Bakterien eine interindividuelle Strategie mit dem genannten Ziel verwendet. Das anfangs als Verursacher der Katzenkratzkrankheit vermutete Bakterium *Afipia felis* [9] verhindert beispielsweise über noch unbekannte Mechanismen die Phagosomenreifung,

indem sie die Fusion von Lysosom und Phagosom gar nicht erst zulässt [190]. *Listeria monzytogenes*, *Shigella flexneri* und *Rickettsia spp.* zerstören das Phagosom vor der Fusion und vermehren sich dann im Zytosol der Zelle. *Coxiella Burnetti* konnte sich so sehr an das Milieu des Phagolysosoms anpassen, dass dieses zur Vermehrung sogar benötigt wird [191]. Diese und andere Beispiele zeigen, dass intrazellulär lebende Bakterien Möglichkeiten gefunden haben, die ursprünglich tödlichen Zellorganellen zu ihrem Nutzen zu modifizieren. Die genauen Mechanismen sind dabei noch nicht final erforscht. *B. henselae* ist bekannt als fakultativ intrazellulär lebendes Bakterium, welches für Wochen und Monate in Endothelzellen und Erythrozyten überleben kann [192] [45]. Die Interaktion mit Makrophagen und die damit zusammenhängenden Mechanismen sind bisher wenig untersucht.

Im Rahmen unserer Arbeit zeigte sich nun, dass *B. henselae* nach Infektion der Makrophagenzelllinie THP-1 innerhalb von zwei Stunden an die Zellen adhärierten und schon nach vier Stunden in Abwesenheit von Opsoninen in großer Zahl internalisiert wurden. Dieses Phänomen konnte auch schon an anderen Makrophagenzelllinien gezeigt werden [173]. Die Internalisierung und die nachfolgende, oben beschriebene Bildung des Phagosoms, wurde von uns mittels Elektronen- und Immunfluoreszenzmikroskopie verifiziert (siehe auch Abbildung 12 und 14 - 16). Bis zur achten Stunde nach Infektion war die Zahl der Zellen annähernd konstant, danach nahm die Anzahl der überlebenden Bakterien jedoch stark ab. Folglich musste die intrazelluläre Tötungsrate ab diesem Zeitpunkt wesentlich größer sein als die Replikationsrate, was im Kontrast zu Berichten von anderen intrazellulären Pathogenen wie *Brucella*, *Listeria* oder *Salmonella* [193] [194] [195] steht. Aufgrund der langen Replikationszeiten von *Bartonella* war dies jedoch zu erwarten. Im Gegensatz dazu ist die Fähigkeit, so viel länger in anderen Zellen wie Endothelzellen und Erythrozyten zu überleben, und dort langandauernde Bakterämien mit immer wiederkehrenden Reinfektionswellen zu erzeugen, bemerkenswert.

Die intrazelluläre Lage und die Bindung an die Zellen konnten lichtmikroskopisch bestätigt werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt

werden, dass schon bei sehr niedrigen MOIs und nach zwei Stunden Inkubationszeit eine sehr homogene Infektion erreicht wurde, in der über 90 Prozent der Zellen infiziert waren.

Auch elektronenmikroskopisch konnte die intrazelluläre Lage und Bindung an die Zellen bestätigt werden. Auffällig waren die sich scheinbar teilenden Zellen und die deutlich sichtbaren Strukturen zwischen den Bakterien und den Zellen innerhalb des Phagosoms.

Erste Hinweise auf das Stadium der Reifung des Phagosoms und die Mechanismen, die *B. henselae* entwickelt hat, um intrazellulär zu überleben, geben die von uns gewonnenen Erkenntnisse, dass das intrazelluläre Überleben der passagierten Bakterien 48 Stunden nach Infektion zwar signifikant schlechter ist, die Ausschüttung des Zytokins TNF- α jedoch nicht unterschiedlich zwischen passagierten und nicht passagierten Bakterien ist. Dies ist relevant, weil bekannt ist, dass die Expression mindestens eines Pathogenitätsfaktors („Typ IV-ähnlicher Pilus“, siehe oben) durch das Passagieren der Bakterien auf Columbia-Agarplatten verloren geht [39] [64]. Es scheint also kein Typ IV-ähnlicher Pilus vermittelter Mechanismus zu sein.

Auch konnte kein Unterschied in der proinflammatorischen Antwort bei Infektion mit hitzeinaktivierten Bakterien festgestellt werden. Anscheinend haben die passagierten Bartonellen eine Fähigkeit während ihrer Passagen verloren, die ihnen das intrazelluläre Überleben erleichtert. Bis zur Stunde 24 gibt es zumindest in der TNF- α Ausschüttung keine signifikanten Unterschiede.

7.3 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von *B. henselae* mit der Makrophagen Zelllinie THP-1 und mit primären humanen Makrophagen und ihre Reaktionen auf die Infektion mit dem Erreger untersucht. Die Anhaftung der Bakterien an die Zelle und deren Eindringen in die Zelle wurde im Rahmen des Gentamycin Essays lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch gezeigt und quantifiziert.

Wie sich das Überleben eines Bakteriums sowie die proinflammatorischen Reaktionen auf das Bakterium nach 50-facher Passage ändert, wurde untersucht. Zusätzlich wurden hitzegetötete Bakterien zur Infektion verwendet, um festzustellen, ob der Vorgang der Auslösung der proinflammatorischen Reaktion ein aktiver oder passiver Mechanismus ist.

In Rahmen unserer Versuche konnte festgestellt werden, dass die Keime nach Infektion schnell an die Zellen adhärierten, internalisiert wurden und dort intrazellulär für einige Zeit überlebten. Dieser Vorgang hatte jedoch eine im Verhältnis sehr niedrige TNF- α Ausschüttung auch bei sehr hohen MOIs zur Folge. Diese Beobachtung konnte sowohl bei der Makrophagenzelllinie THP-1 als auch bei den primären humanen Makrophagen gemacht werden. Genauere Untersuchungen zeigten, dass die Reaktion dosisabhängig ist. Das implizierte, dass niedrigere MOIs auch eine niedrigere Ausschüttung von TNF- α zur Folge hatte. Dieses Phänomen wurde auch bei Infektion mit hitzegetöteten Bakterien beobachtet.

Unsere Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

- (i) *B. henselae* hat einen gewissen Spezialisierungsgrad entwickelt, der die Ausschüttung von TNF- α durch humane Makrophagen vermindert und damit seine intrazellulären Überlebenschancen erhöht.
- (ii) Bei Infektion von humanen Makrophagen mit *B. henselae* adhäriert der Keim zügig, wird in kurzer Zeit internalisiert und überlebt dort mindestens 48 Stunden in großer Anzahl.

(iii) Es scheint kein aktiver Prozess zu sein, da sowohl die hitzeinaktivierten als auch die lebenden Zellen eine verminderte Ausschüttung zur Folge hatten. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass *Brucella spp.* einen spezifischen, Protease-empfindlichen Stoff produziert, der die TNF- α Ausschüttung inhibiert und so die antibakterielle Abwehr umgeht.

7.4 Ausblick

Ein besonders gravierende Rolle spielen Infektionen durch *B. henselae* bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem, beispielsweise im Rahmen von HIV-Infektionen.

Da Makrophagen im Immunsystem eine zentrale Rolle spielen, ist die Untersuchung der Interaktion von *B. henselae* mit diesen zentralen Zellen von großer Bedeutung. Es könnte nun im Rahmen weiterer Untersuchungen analysiert werden, inwiefern die Mechanismen von *B. henselae* gegenüber durch den HI-Virus infizierte Makrophagen ausgeprägter sind, so dass die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine noch weiter verringert wird. Somit wäre intrazelluläres Überleben besser möglich und gleichzeitig würden proangiogenetische und damit Wachstumsvorteil bringende Faktoren wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), IL-1 oder IL-8 [196] vermehrt ausgeschüttet werden.

Zum heutigen Zeitpunkt ist noch wenig über die intrazellulären Replikationsraten von *B. henselae* in den verschiedenen Zellarten bekannt. Erste unveröffentlichte Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe, welche Hinweise auf eine Überlebenszeit von maximal 48 Stunden in Makrophagen geben, lassen im Vergleich zu den Überlebenszeiten in Endothelzellen und Erythrozyten [45] [192] vermuten, dass zumindest beim immunkompetenten Menschen die zum Überleben in Zellen benötigten Mechanismen in Makrophagen nicht so suffizient funktionieren wie in anderen Zellarten.

Die Fragen, in welchem Stadium der Reifung sich das Phagosom befindet, ob das Lysosom schon mit dem Phagosom fusioniert ist, und was letztendlich zum begrenzten Überleben des internalisierten Bakteriums führt, könnte durch weitere Untersuchungen beantwortet werden.

Ein erster wichtiger Faktor, der zumindest ein im Verhältnis kurzzeitiges Überleben ermöglicht, scheint die auch von anderen Bakterien bekannte Modulation der proinflammatorischen Zytokinantwort mittels TNF- α zu sein. Mit welchen genauen Mechanismen es *B. henselae* möglich ist, die Entzündungsantwort zu inhibieren, gilt es in weiteren Versuchen herauszufinden, um diese Unterminierung der natürlichen Abwehr künftig vielleicht zu verhindern.

8 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Mardjan Arvand für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Arbeit und für die exzellente Betreuung und Bereitschaft mir während der gesamten Zeit ständig verfügbar mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Außerdem danke ich Yvonne Humboldt für die technische Unterstützung, Prof. Dr. med. Volker Kiefel für die Bereitstellung der Buffy Coats und Prof. Dr. med Ludwig Jonas für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ganz besonderes danke ich meiner Familie und meinen Freunden insbesondere Martin Behrens, ohne deren Unterstützung mein Studium und damit auch meine Promotion nicht möglich gewesen wäre.

9 Erklärung

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 Universität Rostock zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

10 Literatur

1. Anderson, B.E. and M.A. Neuman, *Bartonella spp. as emerging human pathogens*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(2): p. 203-19.
2. Barton, A., *Descripcion de elementos endoglobulares en los enfermos de Fiebre de Verruga*. Cron. Med. Lima, 1909. **26**: p. 7.
3. Ricketts, W.E., *Clinical manifestations of Carrion's disease*. Arch Intern Med (Chic), 1949. **84**(5): p. 751-81, illust.
4. Stein, A. and D. Raoult, *Return of trench fever*. Lancet, 1995. **345**(8947): p. 450-1.
5. Ohl, M.E. and D.H. Spach, *Bartonella quintana and urban trench fever*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(1): p. 131-5.
6. Brenner, D.J., et al., *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, 1993. **43**(4): p. 777-86.
7. Rolain, J.M., et al., *Recommendations for treatment of human infections caused by Bartonella species*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(6): p. 1921-33.
8. Slater, L.N., et al., *A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia*. N Engl J Med, 1990. **323**(23): p. 1587-93.
9. Regnery, R.L., et al., *Characterization of a novel Rochalimaea species, R. henselae sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(2): p. 265-74.

10. Bergmans, A.M., et al., *Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(2): p. 254-60.
11. Ehrenborg, C., et al., *Sequence variation in the ftsZ gene of *Bartonella henselae* isolates and clinical samples*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(2): p. 682-7.
12. Iredell, J., et al., *Characterization of the natural population of *Bartonella henselae* by multilocus sequence typing*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(11): p. 5071-9.
13. Sander, A., et al., *Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(10): p. 2973-81.
14. Zeaiter, Z., P.E. Fournier, and D. Raoult, *Genomic variation of *Bartonella henselae* strains detected in lymph nodes of patients with cat scratch disease*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(3): p. 1023-30.
15. Viezens, J. and M. Arvand, *Simultaneous presence of two different copies of the 16S rRNA gene in *Bartonella henselae**. Microbiology, 2008. **154**(Pt 9): p. 2881-6.
16. Koehler, J.E., C.A. Glaser, and J.W. Tappero, *Rochalimaea henselae infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir*. Jama, 1994. **271**(7): p. 531-5.
17. Goodman, R.A. and E.B. Breitschwerdt, *Clinicopathologic findings in dogs seroreactive to *Bartonella henselae* antigens*. Am J Vet Res, 2005. **66**(12): p. 2060-4.
18. O'Rourke, L.G., et al., **Bartonella quintana* in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(12): p. 1931-4.
19. Engbaek, K. and P.A. Lawson, *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, 2004. **112**(6): p. 336-41.

20. Harms, C.A., et al., *Bartonella species detection in captive, stranded and free-ranging cetaceans.* Vet Res, 2008. **39**(6): p. 59.

21. Maggi, R.G., et al., *Bartonella henselae in porpoise blood.* Emerg Infect Dis, 2005. **11**(12): p. 1894-8.

22. Maurin, M., R. Birtles, and D. Raoult, *Current knowledge of Bartonella species.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1997. **16**(7): p. 487-506.

23. Higgins, J.A., et al., *Acquisition of the cat scratch disease agent Bartonella henselae by cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae).* J Med Entomol, 1996. **33**(3): p. 490-5.

24. Chomel, B.B., et al., *Experimental transmission of Bartonella henselae by the cat flea.* J Clin Microbiol, 1996. **34**(8): p. 1952-6.

25. Rolain, J.M., et al., *Molecular detection of Bartonella quintana, B. koehlerae, B. henselae, B. clarridgeiae, Rickettsia felis, and Wolbachia pipiensis in cat fleas, France.* Emerg Infect Dis, 2003. **9**(3): p. 338-42.

26. Finkelstein, J.L., et al., *Studies on the growth of Bartonella henselae in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae).* J Med Entomol, 2002. **39**(6): p. 915-9.

27. Chang, C.C., et al., *Molecular evidence of Bartonella spp. in questing adult Ixodes pacificus ticks in California.* J Clin Microbiol, 2001. **39**(4): p. 1221-6.

28. Lucey, D., et al., *Relapsing illness due to Rochalimaea henselae in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations.* Clin Infect Dis, 1992. **14**(3): p. 683-8.

29. Sanogo, Y.O., et al., *Bartonella henselae in Ixodes ricinus ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy.* Emerg Infect Dis, 2003. **9**(3): p. 329-32.

30. Chung, C.Y., et al., *Bartonella* spp. DNA associated with biting flies from California. *Emerg Infect Dis*, 2004. **10**(7): p. 1311-3.
31. Daly, J.S., et al., *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol*, 1993. **31**(4): p. 872-81.
32. Roux, V., et al., *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(4): p. 1698-700.
33. Kerkhoff, F.T., et al., Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(12): p. 4034-8.
34. Kordick, D.L., et al., *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J Clin Microbiol*, 1997. **35**(7): p. 1813-8.
35. Wong, M.T., et al., A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea* (*Bartonella*) *henselae* from blood and tissue specimens. *J Clin Microbiol*, 1995. **33**(3): p. 742-4.
36. Breitschwerdt, E.B. and D.L. Kordick, *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev*, 2000. **13**(3): p. 428-38.
37. Kosoy, M., et al., *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(2): p. 645-50.
38. Drancourt, M. and D. Raoult, Proposed tests for the routine identification of *Rochalimaea* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1993. **12**(9): p. 710-3.
39. Batterman, H.J., et al., *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun*, 1995. **63**(11): p. 4553-6.

40. Dehio, C., *Bartonella-host-cell interactions and vascular tumour formation*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(8): p. 621-31.
41. Dehio, C., et al., *Interaction of Bartonella henselae with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 18): p. 2141-54.
42. Zbinden, R., M. Hochli, and D. Nadal, *Intracellular location of Bartonella henselae cocultivated with Vero cells and used for an indirect fluorescent-antibody test*. Clin Diagn Lab Immunol, 1995. **2**(6): p. 693-5.
43. Brouqui, P. and D. Raoult, *Bartonella quintana invades and multiplies within endothelial cells in vitro and in vivo and forms intracellular blebs*. Res Microbiol, 1996. **147**(9): p. 719-31.
44. Kempf, V.A., et al., *Interaction of Bartonella henselae with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication*. Cell Microbiol, 2000. **2**(5): p. 431-41.
45. Schulein, R., et al., *Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen Bartonella*. J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1077-86.
46. Koesling, J., et al., *Cutting edge: antibody-mediated cessation of hemotropic infection by the intraerythrocytic mouse pathogen Bartonella grahamii*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 11-4.
47. Mandle, T., et al., *Infection of human CD34+ progenitor cells with Bartonella henselae results in intraerythrocytic presence of B. henselae*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1215-22.
48. Kemper, C.A., et al., *Visceral bacillary epithelioid angiomatosis: possible manifestations of disseminated cat scratch disease in the immunocompromised host: a report of two cases*. Am J Med, 1990. **89**(2): p. 216-22.

49. Koehler, J.E., et al., *Cutaneous vascular lesions and disseminated cat-scratch disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex*. Ann Intern Med, 1988. **109**(6): p. 449-55.
50. LeBoit, P.E., et al., *Epithelioid haemangioma-like vascular proliferation in AIDS: manifestation of cat scratch disease bacillus infection?* Lancet, 1988. **1**(8592): p. 960-3.
51. LeBoit, P.E., et al., *Bacillary angiomatosis. The histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease*. Am J Surg Pathol, 1989. **13**(11): p. 909-20.
52. Conley, T., L. Slater, and K. Hamilton, *Rochalimaea species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro*. J Lab Clin Med, 1994. **124**(4): p. 521-8.
53. Maeno, N., et al., *Live *Bartonella henselae* enhances endothelial cell proliferation without direct contact*. Microb Pathog, 1999. **27**(6): p. 419-27.
54. Kempf, V.A., et al., *Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections*. Circulation, 2005. **111**(8): p. 1054-62.
55. Garcia, F.U., et al., *Bartonella bacilliformis stimulates endothelial cells in vitro and is angiogenic in vivo*. Am J Pathol, 1990. **136**(5): p. 1125-35.
56. Maurin, M. and D. Raoult, *Bartonella (Rochalimaea) quintana infections*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(3): p. 273-92.
57. Cossart, P. and P.J. Sansonetti, *Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens*. Science, 2004. **304**(5668): p. 242-8.
58. Kirby, J.E. and D.M. Nekorchuk, *Bartonella-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S

A, 2002. **99**(7): p. 4656-61.

59. Munford, R.S. and A.W. Varley, *Shield as signal: lipopolysaccharides and the evolution of immunity to gram-negative bacteria*. PLoS Pathog, 2006. **2**(6): p. e67.

60. Riess, T., et al., *Bartonella adhesin a mediates a proangiogenic host cell response*. J Exp Med, 2004. **200**(10): p. 1267-78.

61. Fuhrmann, O., et al., *Bartonella henselae induces NF-kappaB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors*. Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 5088-97.

62. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, A.M.d.M., Ana Maria Uthida-Tanaka, Maria Letícia Cintra, Rovilson Gigliogi, *Ultrastructural Changes in a Standard Strain of Bartonella henselae After Passages Through BALB/cAn Mice*. Ultrastructural Pathology, 2002. **26**(3): p. 161 - 169.

63. Koehler, J.E., F. D. Quinn, T. G. Berger, P. E. LeBoit, and J. W. Tappero, *Isolation of Rochalimaea species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis*. N. Engl. J., 1992. **327**: p. 1625 - 1631.

64. Kempf, V.A., et al., *Evidence of a leading role for VEGF in Bartonella henselae-induced endothelial cell proliferations*. Cell Microbiol, 2001. **3**(9): p. 623-32.

65. Rodriguez-Barradas, M.C., et al., *In vitro evaluation of the role of humoral immunity against Bartonella henselae*. Infect Immun, 1995. **63**(6): p. 2367-70.

66. Kaufmann, S.H., *Immunity to intracellular bacteria*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 129-63.

67. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.

68. Ono, M., et al., *Biological implications of macrophage infiltration in*

human tumor angiogenesis. Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **43 Suppl:** p. S69-71.

69. Sunderkotter, C., et al., *Macrophages and angiogenesis.* J Leukoc Biol, 1994. **55**(3): p. 410-22.

70. Relman, D.A., et al., *The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens.* N Engl J Med, 1990. **323**(23): p. 1573-80.

71. Koehler, J.E., et al., *Isolation of Rochalimaea species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis.* N Engl J Med, 1992. **327**(23): p. 1625-31.

72. Jackson, L.A., B.A. Perkins, and J.D. Wenger, *Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases.* Am J Public Health, 1993. **83**(12): p. 1707-11.

73. Bass, J.W., J.M. Vincent, and D.A. Person, *The expanding spectrum of Bartonella infections: II. Cat-scratch disease.* Pediatr Infect Dis J, 1997. **16**(2): p. 163-79.

74. Carithers, H.A., *Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients.* Am J Dis Child, 1985. **139**(11): p. 1124-33.

75. Wear, D.J., et al., *Cat scratch disease: a bacterial infection.* Science, 1983. **221**(4618): p. 1403-5.

76. Wong, M.T., et al., *Neuroretinitis, aseptic meningitis, and lymphadenitis associated with Bartonella (Rochalimaea) henselae infection in immunocompetent patients and patients infected with human immunodeficiency virus type 1.* Clin Infect Dis, 1995. **21**(2): p. 352-60.

77. Dolan, M.J., et al., *Syndrome of Rochalimaea henselae adenitis suggesting cat scratch disease.* Ann Intern Med, 1993. **118**(5): p. 331-6.

78. Golden, S.E., *Hepatosplenic cat-scratch disease associated with elevated anti-Rochalimaea antibody titers.* Pediatr Infect Dis J, 1993.

12(10): p. 868-71.

79. Kempf, V.A., H. Petzold, and I.B. Autenrieth, *Cat scratch disease due to Bartonella henselae infection mimicking parotid malignancy*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2001. **20**(10): p. 732-3.

80. Margileth, A.M., *Cat scratch disease*. Adv Pediatr Infect Dis, 1993. **8**: p. 1-21.

81. Schwartzman, W.A., *Infections due to Rochalimaea: the expanding clinical spectrum*. Clin Infect Dis, 1992. **15**(6): p. 893-900.

82. Debre, R., et al., [Cat scratch disease]. Sem Hop, 1950. **26**(40): p. 1895-1904.

83. Bergmans, A.M., et al., *Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of Bartonella henselae-based indirect fluorescence assay and enzyme-linked immunoassay*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(8): p. 1931-7.

84. Giladi, M., et al., *Cat scratch disease: the rare role of Afipia felis*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(9): p. 2499-502.

85. Regnery, R.L., et al., *Serological response to "Rochalimaea henselae" antigen in suspected cat-scratch disease*. Lancet, 1992. **339**(8807): p. 1443-5.

86. Tappero, J.W., et al., *Bacillary angiomatosis and bacillary splenitis in immunocompetent adults*. Ann Intern Med, 1993. **118**(5): p. 363-5.

87. Welch, D.F., et al., *Rochalimaea henselae sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(2): p. 275-80.

88. Cockerell, C.J., et al., *Bacillary epithelioid angiomatosis occurring in an immunocompetent individual*. Arch Dermatol, 1990. **126**(6): p. 787-90.

89. Böhm, I., et al., *Die Bazilläre Angiomatose*. Dt. Ärzteblatt, 1995. **92**(27):

p. A-1916-1921.

90. Koehler, J.E.T., J.W., *Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus*. Clin. Infect. Dis., 1993. **17**: p. 612 - 24.

91. Adal, K.A., C.J. Cockerell, and W.A. Petri, Jr., *Cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and other infections due to *Rochalimaea**. N Engl J Med, 1994. **330**(21): p. 1509-15.

92. Brancatelli, G., et al., *Helical CT Screening for Hepatocellular Carcinoma in Patients with Cirrhosis: Frequency and Causes of False-Positive Interpretation*. American Journal of Roentgenology AJR, 2003. **180**: p. 1007-14.

93. Mateen, F.J., J.C. Newstead, and K.L. McClean, *Bacillary angiomatosis in an HIV-positive man with multiple risk factors: A clinical and epidemiological puzzle*. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, 2005. **16**(4): p. 249-52.

94. Monteil, R.A., et al., *Histological and ultrastructural study of one case of oral bacillary angiomatosis in HIV disease and review of the literature*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1994. **30B**(1): p. 65-71.

95. Mohle-Boetani, J.C., et al., *Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus: clinical characteristics in a case-control study*. Clin Infect Dis, 1996. **22**(5): p. 794-800.

96. Müller, H.E., *Rochalimaea henselae: Der Erreger von bakterieller Angiomatose, Peliosis hepatis und Septikämie*. Münch. Med. Wschr., 1992. **134**: p. 741-3.

97. Spach, D.H. and J.E. Koehler, *Bartonella-associated infections*. Infect Dis Clin North Am, 1998. **12**(1): p. 137-55.

98. Burrowes, P. and P. Goodman, *Multiple pulmonary nodules as a*

manifestation of cat-scratch disease. Can Assoc Radiol J, 1995. **46**(1): p. 48-50.

99. Zangwill, K.M., et al., *Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test.* N Engl J Med, 1993. **329**(1): p. 8-13.

100. Ridder, G.J., et al., *Role of cat-scratch disease in lymphadenopathy in the head and neck.* Clin Infect Dis, 2002. **35**(6): p. 643-9.

101. Del Prete, R., et al., *Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with suspected cat scratch disease (CSD) in Italy.* Eur J Epidemiol, 1999. **15**(6): p. 583-7.

102. Harrison, T.G. and N. Doshi, *Serological evidence of *Bartonella* spp. infection in the UK.* Epidemiol Infect, 1999. **123**(2): p. 233-40.

103. Sander, A., R. Berner, and M. Ruess, *Serodiagnosis of cat scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2001. **20**(6): p. 392-401.

104. Not, T., et al., *Serologic response to *Bartonella henselae* in patients with cat scratch disease and in sick and healthy children.* Acta Paediatr, 1999. **88**(3): p. 284-9.

105. Kordick, D.L., et al., *Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients.* J Clin Microbiol, 1995. **33**(12): p. 3245-51.

106. Sander, A., et al., *Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany.* J Clin Microbiol, 1997. **35**(3): p. 584-7.

107. Sander, A., T. Kaliebe, and W. Bredt, *[*Bartonella (Rochalimaea)* infections: cat-scratch disease and bacillary angiomatosis].* Dtsch Med Wochenschr, 1996. **121**(3): p. 65-9.

108. Haimerl, M., et al., *Seroprevalence of Bartonella henselae in cats in Germany*. J Med Microbiol, 1999. **48**(9): p. 849-56.
109. Jameson, P., et al., *Prevalence of Bartonella henselae antibodies in pet cats throughout regions of North America*. J Infect Dis, 1995. **172**(4): p. 1145-9.
110. Dalton M.J., R.L.E., Cooper J., Regnery R.L., Olson J.G., Childs J.E., *Use of Bartonella antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a national referral center*. Arch. intern. med., 1995. **155**: p. 1670-1676.
111. Barka N.E., H.T., Patnaik M., Schwarzmann W.A., Peter J.B, *EIA for detection of *Rochalimaea henselae*-reactive IgG, IgM and IgA antibodies in patients with suspected cat-scratch disease*. J. Infect. Dis, 1993. **167**: p. 1503 - 1504.
112. Raoult D., D.H.T., Enea-Mutillod E, *Positiv predictive value of *Rochalimaea henselae* antibodies in the diagnosis of cat scratch disease*. Clin. infect. Dis., 1994. **19**: p. 355.
113. Raoult, D., et al., *Bartonella (Rochalimaea) quintana isolation in patient with chronic adenopathy, lymphopenia, and a cat*. Lancet, 1994. **343**(8903): p. 977.
114. Agan, B.K. and M.J. Dolan, *Laboratory diagnosis of Bartonella infections*. Clin Lab Med, 2002. **22**(4): p. 937-62.
115. Nadal D., Z.R., *Serology to Bartonella (Rochalimaea) henselae may replace traditional diagnostic criteria for cat-scratch disease*. Eur. J. Pediatr, 1995. **154**: p. 906 - 908.
116. Sander A., P.M., Oberle K., Bredt W, *Seroprevalence to Bartonella henselae in patients with CSD and in healthy controls. Evaluation and comparison of two commercial serological tests*. Clin. Diagn. Lab. Immunol, 1998. **5**: p. 486-90.
117. Rath P.M., v.R.G., Ansorg R., *Seroprevalence of Immunoglobulin G*

antibodies to Bartonella henselae in cat owners. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1997. **16**: p. 326-27.

118. Fournier, P.E., et al., *Improved culture from lymph nodes of patients with cat scratch disease and genotypic characterization of Bartonella henselae isolates in Australia.* J Clin Microbiol, 2002. **40**(10): p. 3620-4.

119. Anderson, B., et al., *Detection of Rochalimaea henselae DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR.* J Clin Microbiol, 1994. **32**(4): p. 942-8.

120. Maurin, M., et al., *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, 1994. **32**(5): p. 1166-71.

121. Arvand, M. and S.G. Schäd, *Isolation of Bartonella henselae DNA from the Peripheral Blood of a Patient with Cat Scratch Disease up to 4 Months after the Cat Scratch Injury.* Journal of Clinical Microbiology, June 2006. **44**(6): p. 2288-90.

122. Sander A., R.M., Deichmann K., Böhm N., Bredt W., *Two different genotypes of Bartonella henselae in children with cat-scratch disease and their pet cats.* Scand. J. Infect. Dis., 1998. **30**: p. 387-91.

123. R.O.C., K., *Infectious diseases.* 3rd Edition ed. Paediatric Pathology., ed. B. C. 1996, London: Springer. 729-820.

124. La Scola, B. and D. Raoult, *Culture of Bartonella quintana and Bartonella henselae from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998).* J Clin Microbiol, 1999. **37**(6): p. 1899-905.

125. Gilbert, D.N., R.C. Moellering, and M.A. Sande, *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy.* 1999. **29**.

126. Rudikoff, D., et al., *Acquired immunodeficiency syndrome-related bacillary vascular proliferation (epithelioid angiomyomatosis): rapid response to erythromycin therapy*. Arch Dermatol, 1989. **125**(5): p. 706-7.
127. Berger, T.G. and J.E. Koehler, *Bacillary angiomyomatosis*. AIDS Clin Rev, 1993: p. 43-60.
128. Karnovsky, M.L., *Metchnikoff in Messina: a century of studies on phagocytosis*. N Engl J Med, 1981. **304**(19): p. 1178-80.
129. van Furth, R., *The mononuclear phagocyte system*. Verh Dtsch Ges Pathol, 1980. **64**: p. 1-11.
130. Beutler, B., et al., *Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells*. J Exp Med, 1985. **161**(5): p. 984-95.
131. Johnson-Leger, C., M. Aurrand-Lions, and B.A. Imhof, *The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair?* J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 6): p. 921-33.
132. Raetz, C.R., *Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction*. J Bacteriol, 1993. **175**(18): p. 5745-53.
133. Jones, G.E., *Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(5): p. 593-602.
134. Ross, J.A. and M.J. Auger, *The biology of the macrophage*, in *The Macrophage*, E. Burke and E.L. Lewis, Editors. 2002, Oxford University Press: New York. p. 1-57.
135. Abul, K., et al., *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders Elsevier, 2007. **6th Edition**: p. 30.
136. Quesniaux, V.F.J. and T.C. Jones, *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*. The Cytokine Handbook, ed. A. Thomson. 1998. 635-70.

137. Flanagan, A.M. and C.S. Lader, *Update on the biologic effects of macrophage colony-stimulating factor*. Curr Opin Hematol, 1998. **5**(3): p. 181-5.
138. Hanson, L.K. and C.A. E., *Determinants of Macrophage Tropism: Macrophage differentialtion*. Cytomegalovirus: Molecular biology and Immunology, ed. R.M. J. 2006, Norfolk: Caister Academic Press. p. 423-4.
139. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. Int J Cancer, 1980. **26**(2): p. 171-6.
140. Arai, K.I., et al., *Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 783-836.
141. Loppnow, H., [Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]. Internist (Berl), 2001. **42**(1): p. 13-4, 17-27.
142. Stadnyk, A.W., *Cytokine production by epithelial cells*. Faseb J, 1994. **8**(13): p. 1041-7.
143. Mantovani, A., F. Bussolino, and M. Introna, *Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside*. Immunol Today, 1997. **18**(5): p. 231-40.
144. Cannon, J.G., et al., *Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever*. J Infect Dis, 1990. **161**(1): p. 79-84.
145. Endres, S., J.W. van der Meer, and C.A. Dinarello, *Interleukin-1 in the pathogenesis of fever*. Eur J Clin Invest, 1987. **17**(6): p. 469-74.
146. Marshall, G.D., Jr., et al., *Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students*. Brain Behav Immun, 1998. **12**(4): p. 297-307.
147. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.

148. Kawakami, M. and A. Cerami, *Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity*. J Exp Med, 1981. **154**(3): p. 631-9.
149. Tracey, K.J., H. Vlassara, and A. Cerami, *Cachectin/tumour necrosis factor*. Lancet, 1989. **1**(8647): p. 1122-6.
150. Beutler, B.A., I.W. Milsark, and A. Cerami, *Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo*. J Immunol, 1985. **135**(6): p. 3972-7.
151. Hehlgans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
152. Waetzig, G.H., et al., *Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor-beta1*. Faseb J, 2005. **19**(1): p. 91-3.
153. Shu, H.B., M. Takeuchi, and D.V. Goeddel, *The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13973-8.
154. Schmid, M.C., et al., *The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells*. Mol Microbiol, 2004. **52**(1): p. 81-92.
155. Rolain, J.M., et al., *Bartonella quintana in human erythrocytes*. Lancet, 2002. **360**(9328): p. 226-8.
156. Arvand, M., et al., *Characterization of *Bartonella henselae* isolated from bacillary angiomatosis lesions in a human immunodeficiency virus-infected patient in Germany*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(6): p. 1296-9.
157. Morahan, P.S., *Macrophage nomenclature: where are we going?* J Reticuloendothel Soc, 1980. **27**(2): p. 223-45.

158. Treves, A.J., *The origin of monocyte-macrophage heterogeneity: possible alternatives*. Med Hypotheses, 1984. **14**(4): p. 335-46.
159. Goff, W.L., et al., *The role of IL-10 in iNOS and cytokine mRNA expression during in vitro differentiation of bovine mononuclear phagocytes*. J Interferon Cytokine Res, 1998. **18**(3): p. 139-49.
160. Heesemann, J. and R. Laufs, *Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture*. J Clin Microbiol, 1985. **22**(2): p. 168-75.
161. Gan, H., et al., *TNF-alpha response of human monocyte-derived macrophages to *Mycobacterium avium*, serovar 4, is of brief duration and protein kinase C dependent*. J Immunol, 1993. **150**(7): p. 2892-900.
162. Kelly, N.M., L. Young, and A.S. Cross, *Differential induction of tumor necrosis factor by bacteria expressing rough and smooth lipopolysaccharide phenotypes*. Infect Immun, 1991. **59**(12): p. 4491-6.
163. Staugas, R.E., et al., *Induction of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) by *Pseudomonas aeruginosa* and exotoxin A-induced suppression of lymphoproliferation and TNF, lymphotoxin, gamma interferon, and IL-1 production in human leukocytes*. Infect Immun, 1992. **60**(8): p. 3162-8.
164. Miller, L.C., et al., *Live *Borrelia burgdorferi* preferentially activate interleukin-1 beta gene expression and protein synthesis over the interleukin-1 receptor antagonist*. J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 906-12.
165. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Metabolic responses to cachectin/TNF. A brief review*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **587**: p. 325-31.
166. Karem, K.L., et al., *Characterization of *Bartonella henselae*-specific immunity in BALB/c mice*. Immunology, 1999. **97**(2): p. 352-8.
167. Regnath, T., et al., *Murine model of *Bartonella henselae* infection in the immunocompetent host*. Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5534-6.

168. Herbein, G. and A. Varin, *The macrophage in HIV-1 infection: From activation to deactivation?* Retrovirology, 2010. **7**: p. 33.
169. Keane, J., et al., *Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent.* N Engl J Med, 2001. **345**(15): p. 1098-104.
170. Slifman, N.R., et al., *Listeria monocytogenes infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor alpha-neutralizing agents.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(2): p. 319-24.
171. Wallis, R.S. and S. Ehlers, *Tumor necrosis factor and granuloma biology: explaining the differential infection risk of etanercept and infliximab.* Semin Arthritis Rheum, 2005. **34**(5 Suppl1): p. 34-8.
172. Rietschel, E.T., et al., *Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity.* Prog Clin Biol Res, 1987. **231**: p. 25-53.
173. Musso, T., et al., *Interaction of Bartonella henselae with the murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response.* Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 5974-80.
174. Telepnev, M., I. Golovliov, and A. Sjostedt, *Francisella tularensis LVS initially activates but subsequently down-regulates intracellular signaling and cytokine secretion in mouse monocytic and human peripheral blood mononuclear cells.* Microb Pathog, 2005. **38**(5-6): p. 239-47.
175. Matera, G., et al., *Bartonella quintana lipopolysaccharide effects on leukocytes, CXC chemokines and apoptosis: a study on the human whole blood and a rat model.* Int Immunopharmacol, 2003. **3**(6): p. 853-64.
176. Caron, E., et al., *Brucella species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF-alpha expression, active on human macrophage-like cells.* J Immunol, 1996. **156**(8): p. 2885-93.

177. Barquero-Calvo, E., et al., *Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection*. PLoS One, 2007. **2**(7): p. e631.
178. Kim, L., B.A. Butcher, and E.Y. Denkers, *Toxoplasma gondii interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3003-10.
179. Orth, K., et al., *Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector*. Science, 1999. **285**(5435): p. 1920-3.
180. Orth, K., et al., *Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease*. Science, 2000. **290**(5496): p. 1594-7.
181. Carrera, L., et al., *Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice*. J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 515-26.
182. Marth, T. and B.L. Kelsall, *Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling*. J Exp Med, 1997. **185**(11): p. 1987-95.
183. Covelli, V., et al., *Pathogenetic role of phagocytic abnormalities in human virus immunodeficiency infection: possible therapeutical approaches. A review*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1997. **19**(2): p. 147-64.
184. Crowe, S.M., *Role of macrophages in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection*. Aust N Z J Med, 1995. **25**(6): p. 777-83.
185. Biggs, B.A., et al., *HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of Toxoplasma gondii*. J Immunol, 1995. **154**(11): p. 6132-9.
186. Crowe, S.M., et al., *HIV infection of monocyte-derived macrophages in vitro reduces phagocytosis of Candida albicans*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(3): p. 318-27.

187. Duclos, S. and M. Desjardins, *Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens*. Cell Microbiol, 2000. **2**(5): p. 365-77.
188. Haas, A., *Reprogramming the phagocytic pathway--intracellular pathogens and their vacuoles (review)*. Mol Membr Biol, 1998. **15**(3): p. 103-21.
189. Alberts, B., *Molecular Biology of the Cell*. 4. Auflage ed. 2002, New York: Garland Science.
190. Luhrmann, A., et al., *Afipia felis induces uptake by macrophages directly into a nonendocytic compartment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7271-6.
191. Haas, A., *Wenn Freßzellen Verdauungsstörung haben - ungewöhnliche Phagosomenbiogenese in Makrophagen*, in *BIOspektrum*. 2002. p. 243 - 7.
192. McCord, A.M., et al., *Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells promotes monocyte/macrophage chemoattractant protein 1 gene expression and protein production and triggers monocyte migration*. Infect Immun, 2005. **73**(9): p. 5735-42.
193. Buchmeier, N., et al., *SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella typhimurium*, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages*. Infect Immun, 1997. **65**(9): p. 3725-30.
194. de Chastellier, C. and P. Berche, *Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria*. Infect Immun, 1994. **62**(2): p. 543-53.
195. Eze, M.O., et al., *Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro*. Infect Immun, 2000. **68**(1): p. 257-63.

196. McCord, A.M., S.I. Resto-Ruiz, and B.E. Anderson, *Autocrine role for interleukin-8 in Bartonella henselae-induced angiogenesis*. Infect Immun, 2006. **74**(9): p. 5185-90.
197. Eck, M.J., Sprang, S.R., structure of tumor necrosis factor- α at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. J. Biol. Chem., 1989. **V264**: p. 17595-605.