

II. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose (Ultra Pure)	GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, UK
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
DNA-Ladder	GIBCO BRL, Life Technologies, Paisley, UK
dNTP-Set 1	Roth, Karlsruhe
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt
Histologie-Eindeckmedium Entellan	Merck, Darmstadt
InViTAQ DNA-Polymerase	InViTek, Berlin
Isopropylalkohol	Sigma, Deisenhofen
Ladepuffer	Eigenherstellung
Magnesiumlösung	InViTek, Berlin
Meyers Hämalaulösung	Merck, Darmstadt
PBS	Eigenherstellung
PCR-Puffer	InViTek, Berlin
Primer	TIB MOL BIOL, Berlin
TBE-Puffer	Eigenherstellung
Xylol (reinst)	Mallinckrodt-Baker B.V., Deventer, NL

2.1.2 Geräte

Brutschrank	Heraeus-Service, Berlin
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer, Bodenseewerk, Ueberlingen
Elektronische Analysenwaage 1712 MP 8	Sartorius, Göttingen

Elektrophorese-Bad, DNA Sub Cell	BIO-RAD, München
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Homogenisator	Braun, Melsungen
Kamera MP 4	Polaroid, Offenbach
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Microtom HM 400	Microm, Heidelberg
Spannungsgeber, Power Supply 2301	BIO-RAD, München
Sterile Werkbank	Bio-Flow Technik, Berlin
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator, Reprostar II	Camag
Zentrifuge Varifuge RF	Heraeus-Service, Berlin

2.1.3 Verbrauchs- und Glaswaren

<i>Bartonella</i> Immunfluoreszenztest IgG	Genzyme Virotech, Rüsselsheim
Biopsy-Cassettes	Tissue Tek, Sakura Finetek B.V., UK
Cyro-Tubes	Nunc, Nalge Nunc International, DK
Diapositiv-Filme, 64 T	Kodak, Stuttgart
Einmal-Injektions-Kanülen, Gr. 14 Luer-Lock	Braun, Melsungen
Gel-Träger, GT UVTP Gel tray	BIO-RAD, München
Homogenisierkolben	Schmidt, Berlin
Homogenisierpistille (groß)	Schmidt, Berlin
Homogenisierpistille (klein)	Eppendorf, Hamburg
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg
Pinzetten	Aeskulap, Tuttlingen
Pipettenspitzen, Sterilfilter	Molecular Bio Products, Fisher Scientific, Berlin
Polaroidkamera-Filme S/W #667	Polaroid, Offenbach
QIAmp Tissue Kit (250)	Quiagen, Hilden
Safe-Lock 0,5 ml, Micro Test Tubes	Eppendorf, Hamburg
Safe-Lock 1,5 ml, Micro Test Tubes	Eppendorf, Hamburg
Scheren	Aeskulap, Tuttlingen

Tuberkulin-Spritzen, Omnifix-F 1 ml Plus	Braun, Melsungen
Zentrifugenröhrchen, Blue caps (50 ml)	Nunc, Nalge Nunc International, DK

2.1.4 Kulturmedien für Bakterien

Brucella Broth	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Columbia-Agar-Base	Oxoid LTD., Basingstoke, UK
Columbia-Agar-Platten	Eigenherstellung
Fildes Extract	Oxoid LTD, Basingstoke, UK
Hämin, bovin	Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WIS, USA
Humanes Blut	Blutbank, UKBF, Berlin

2.1.5 Bakterien

1. *B.-h.*-Stamm ATCC #49882: Houston-1-Isolat (American Type Culture Collection, #49882; Rockville, MD, USA)
2. *B.-h.*-Stamm B1: Isolat aus der Hautläsion eines HIV-positiven Patienten mit Bazillärer Angiomatose (Institut für Infektionsmedizin, UKBF, Berlin)¹⁰⁰
3. *B.-h.*-Stamm B2: Isolat aus dem Blut der Katze eines Patienten mit KKK (Institut für Infektionsmedizin, UKBF, Berlin)

2.1.6 Primer

Die Primersequenzen für den Nachweis von *B.-h.*-spezifischer DNS mittels Nukleinsäure-amplifikation wurden Artikeln von Anderson et al. und Mouritsen et al. entnommen.^{104, 105, 106}

Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma Tib Mol Biol, Berlin.

Primersequenzen:

CAT1 (Basennummer 1083 bis 1106): 5'- GAT TCA ATT GGT TTG AAG GAG GCT

CAT2 (Basennummer 1500 bis 1480): 5'- TCA CAT CAC CAG GAC GTA TTC

RH1 (Basennummer 1110 bis 1129): 5' - GGT GCG TTA ATT ACC GAT CC

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Mäuse

Die für die Virulenzpassagen und für den Versuch verwendeten Mäuse stammten aus der Zucht des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Benjamin Franklin. Die Tiere hatten freien Zugang zu keimarmem Wasser und keimarmem Futter und wurden unter pathogenfreien Bedingungen gehalten.

Für den Versuch wurden 10 bis 14 Wochen alte weibliche C57BL/6-Mäuse verwendet.¹⁰⁷

Die Virulenzpassagen wurden mit Balb/c-Mäusen durchgeführt.

2.2.2 Tierversuchsgenehmigung

Die Tierversuche wurden unter den Aktenzeichen G 0258/97 und G 0286/97 genehmigt.

2.3 Methoden

2.3.1 Kulturbedingungen

Die Anzucht von *B.h.* erfolgte mit Hilfe fester und flüssiger Kulturmedien. Verwendet wurden Columbia-Agar-Platten mit 5% humanem Blut und Brucella-Bouillon mit 7% Fildes Extract und 250 µl/ml Haemin. Die Nährmedien wurden bei 37°C und 7% CO₂ für drei Wochen inkubiert.

2.3.2 Keimzahlbestimmung einer Bakteriensuspension

Zur Bestimmung der Erregerdichte einer Bakteriensuspension wurden mit 0,9%iger Kochsalzlösung logarithmische Verdünnungsreihen angefertigt. Jede Verdünnungsstufe wurde auf drei Columbia-Agar-Platten ausgestrichen. Nach drei Wochen wurde die Kolonien ausgezählt und durch Mittelwertbildung der Ergebnisse aller bewachsenen Platten die Erregerkonzentration der Ausgangssuspension errechnet.

2.3.3 Wachstumsverhalten von *B.h.* in vitro

Der Versuch sollte mit möglichst hohen Konzentrationen vermehrungsfähiger Bartonellen durchgeführt werden. Zur Ermittlung der hierfür optimalen Vermehrungsphase wurde das Wachstumsverhalten der Erreger untersucht, indem über acht Tage täglich die Keimzahl in 50 ml Nährbouillon bestimmt wurde, ausgehend von einer Anfangskonzentration von 1×10^3 – 1×10^4 KBE/ml. Es sollte der Zeitpunkt bestimmt werden, an dem sich die Erreger am Ende ihrer logarithmischen Vermehrung befanden, da sie dann ihre höchste Stoffwechselaktivität bei hoher Erregerkonzentration aufwiesen. Um die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Wachstumskurven zu sichern, wurde die Untersuchung mit jedem Erregerstamm zweimal wiederholt.

2.3.4 Virulenzpassagen

Die vielfache In-vitro-Subkultivierung von Bakterien kann durch Fehlen des natürlichen Selektionsdrucks zum Verlust von Virulenzfaktoren führen. Die Virulenz von Erregern in Mäusen lässt sich aber durch initial mindestens drei In-vivo-Passagen erhöhen.¹⁰⁰ Daher wurden mit jedem *B.-h.*-Stamm fünf Tierpassagen vorgenommen.

2.3.4.1 Herstellen des Inokulums

Jeweils fünf Nährbouillons wurden mit den *B.-h.*-Stämmen B1, ATCC #49882 und B2 beimpft und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach vier Tagen wurden die Kulturröhrchen bei 5000 U/min und 4°C über 30 min. zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment von jeweils zwei Röhrchen in 40 ml steriler PBS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Nach einem vierten Zentrifugiervorgang wurden jeweils die Bakterien aller fünf Portionen in 5 ml PBS resuspendiert und sofort für die erste Tierpassage verwendet. Die initiale Infektionsdosis betrug 3×10^6 KBE/ml bei B1 bzw. 2×10^7 KBE/ml bei ATCC #49882 und B2.

2.3.4.2 Infektion der Mäuse

Pro Passage und Erregerstamm wurde eine Balb/c-Maus i.p. mit $1 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ KBE *B.h.* in 500 ml PBS infiziert.

2.3.4.3 Organentnahme

Drei Tage p.i. wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Milz steril entnommen und in 2,5 ml flüssigem Nährmedium homogenisiert.

2.3.4.4 Erregeranzüchtung

Das Milzhomogenisat wurde auf vier Röhrchen mit 50 ml Brucella Broth verteilt und fünf Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden vier neue Nährbouillons mit jeweils 5 ml einer der Röhrchen beimpft und dessen Erregerdichte durch eine Verdünnungsreihe bestimmt. Durch dieses Verfahren konnte eine ausreichende Erregerzahl in der logarithmischen Vermehrungsphase für die jeweils nächste Tierpassage zur Verfügung gestellt werden. Zusätzlich wurde eine kulturelle Kontaminationskontrolle der Nährbouillon durchgeführt. Die vier Subkulturen wurden nach drei Tagen - wie bei der Herstellung des Inokulums beschrieben - zentrifugiert und gewaschen. Nach dem vierten Zentrifugiervorgang wurden die Bakterien aller vier Portionen in drei ml PBS resuspendiert und sofort für die nächste Tierpassage verwendet.

2.3.5 Herstellen des Inokulums für den Hauptversuch

Zur Herstellung einer konzentrierten Erregersuspension wurden für den Versuch für jeden *B.-h.*-Stamm 16 Zentrifugenröhrchen, die je 50 ml des bewachsenen Nährmediums enthielten, bei 5000 U/min und 4°C über 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert. Das Sediment von jeweils zwei Zentrifugenröhrchen wurde in 40 ml steriler PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Zum Schluß waren die Bakterien aller Nährmedien in 8 ml PBS suspendiert. Die Suspension wurde in Portionen von 1 ml bei -70°C gelagert.

Nach Auftauen erhielt man so für den *B.-h.*-Stamm B1 eine Konzentration von 6×10^7 KBE/ml, für ATCC 2×10^7 KBE/ml und für B2 7×10^6 KBE/ml.

2.3.6 Infektion der Mäuse

144 C57BL/6-Mäuse wurden auf drei Gruppen mit jeweils 48 Tieren aufgeteilt, die sich in der Altersstruktur glichen. Die älteren Tiere wurden zu den früheren Untersuchungszeitpunkten untersucht. Die Kontrollmäuse wurden ebenfalls nach Alter sortiert den infizierten Tieren zugeordnet. Alle Mäusegruppen wurden am selben Tag mit jeweils einem der drei *B.-h.*-Stämme infiziert. Hierfür erhielten die Tiere volar in beide Hinterlaufballen eine intradermale Injektion von jeweils 50 μ l eines in PBS suspendierten *B.-h.*-Stammes. Durch Verdünnung der B1- und ATCC-#49882-Konzentrate wurden alle Tiere mit einer Gesamtdosis von $5,5 \times 10^5$ KBE infiziert. Am selben Tag wurde den 24 Tieren der Kontrollgruppe jeweils 50 μ l reines PBS intradermal volar in beide Hinterlaufballen injiziert.

2.3.7 Versuchsplan

Nach Infektion der Mäuse wurde der Verlauf der murinen Infektion mit *B.h.* sowohl lokal als auch systemisch über einen Zeitraum von 20 Wochen verfolgt (Tab. 1) Für die Erfassung der lokalen Reaktionen wurden die Gewebeveränderungen der poplitealen Lymphknoten an Hand des Gewichts der beiden poplitealen Lymphknoten aller infizierten Tiere bestimmt. Zusätzlich wurde pro Untersuchungstermin die zelluläre Immunantwort bei drei Mäusen in den poplitealen Lymphknoten einer Seite beobachtet. Ein direkter Erregernachweis wurde geführt, indem bei drei Mäusen die Lymphknoten einer Seite für Bakterienkulturen und der anderen Seite für den molekularbiologischen Erregernachweis verwendet wurden. Die drei übrigen Lymphknoten wurden für allfällige ergänzende Untersuchungen bei -70°C eingefroren. Der Untersuchung des systemischen Infektionsverlaufs dienten Lebern, Milzen und Blut. Jeweils ein Leberlappen aller infizierten Mäuse wurde für den kulturellen Erregernachweis und die Gewebehistologie verwendet. Von drei Mäusen wurde zusätzlich ein Leberlappen für den molekularbiologischen Erregernachweis aufbereitet. Die Milzen von drei infizierten Tieren wurden halbiert, um den kulturellen und den molekularbiologischen Erregernachweis an dem Organ eines Tieres durchführen zu können. Die Milzen der anderen drei Mäuse wurden

histologisch ausgewertet. Außerdem wurde allen Mäusen 400-600 µl Blut entnommen und für Bakterienkulturen sowie bei jeweils vier Tieren für die Untersuchung der humoralen Immunantwort verwendet.

Tabelle 1 (Versuchsplan): Aufteilung der intradermal mit $5,5 \times 10^5$ KBE eines *B.-h.*-Stammes infizierten C57BL/6-Mäuse zu den untersuchten Organen und Untersuchungsmethoden pro Termin. X: bei diesem Tier durchgeführte Untersuchung, li: linker poplitealer Lymphknoten, re: rechter poplitealer Lymphknoten.

	Maus 1		Maus 2		Maus 3		Maus 4		Maus 5		Maus 6	
Lymphknoten	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re	li	re
Gewicht	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Kultur	X		X		X							
PCR		X		X		X						
Histologie							X		X		X	
Leber	ein Leberlappen pro Untersuchungsmethode											
Kultur	X		X		X		X		X		X	
PCR	X		X		X							
Histologie	X		X		X		X		X		X	
Milz	½	½	½	½	½	½	1		1		1	
Kultur	X		X		X							
PCR		X		X		X						
Histologie							X		X		X	
Blut (µl)	500		500		500		500		500		500	
Kultur	200		200		200		200		500		500	
Serologie		300		300		300		300				

Die Organe der Kontrolltiere wurden für Gewichtsbestimmungen sowie für molekularbiologische, histologische und serologische Kontrolluntersuchungen verwendet.

Die Untersuchungen wurden nach folgendem Zeitplan durchgeführt:



Abbildung 1: Darstellung der Zeitpunkte, an denen die in Tabelle 1 im Versuchsplan dargestellten Untersuchungen durchgeführt wurden. —▶ : Infektionszeitpunkt, d2: 2 Tage p.i., w2-w20: 2-20 Wochen p.i.

2.3.8 Sektion der Mäuse

Für den Versuch wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und mit sterilem Besteck thorakotomiert. Mit sterilen Spritzen wurde aus der rechten Herzkammer 500µl Blut abpunktiert. Die anschließende Organentnahme erfolgte mit einem frischen Satz keimfreier Pinzetten und Scheren.

2.3.9 Kultureller Nachweis von *B.h.*

200 bzw. 400µl Blut wurden sofort nach Entnahme mechanisch hämolysiert und umgehend auf Columbia-Agar ausplattiert. Für die mechanische Hämolysen wurde das Blut unter sterilen Bedingungen abwechselnd 15 Mal rasch mit Kraft aus einer Tuberkulin-Spritze in ein Eppendorfgesäß gedrückt und sofort wieder mit kräftigem Sog aspiriert. Lebern und Milzen wurden in 0,6 ml flüssigem Nährmedium steril mit einem Homogenisator zerkleinert und anschließend auf Columbia-Agar-Platten ausgestrichen. Die Lymphknoten wurden manuell mit Hilfe einer Eppendorf-Pistill in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter keimfreien Bedingungen homogenisiert, in 50 µl Nährbouillon suspendiert und ausplattiert.

2.3.10 Molekularbiologischer Nachweis von *B.h.*

2.3.10.1 Extrahierung der DNS

Für die DNS-Gewinnung wurden ganze Lymphknoten sowie Leber und Milz in Portionen von 25 mg bzw. 10 mg verwendet. Nach mechanischer Zerkleinerung der Gewebe mit Eppendorf-Pistillen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter sterilen Bedingungen wurde die DNS-Aufarbeitung nach den Herstellerangaben eines kommerziellen DNS-Extraktions-Kits durchgeführt („mouse-tail“-Protokoll des QIAamp tissue kits der Firma Quiagen). Die extrahierte DNS wurde entsprechend den Herstellerangaben in 100 µl AE-Puffer gelöst und bei -70°C gelagert.

2.3.10.2 Durchführung der semi-nested PCR

Für die Untersuchung der Organe mittels semi-nested PCR wurden von jeder Probe 15 µl in AE-Puffer gelöster DNS mit 15 µl der einmolaren externen Primer CAT1 und CAT2 und 45,3 µl der Reaktionsmischung versetzt. Das spezifische Produkt dieser Primer hatte eine Sequenz von 417 Basenpaaren (bp).

Die Reaktionsmischung enthielt folgende Bestandteile:

1. 7,5 µl Reaktionspuffer [160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 500 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% Tween 20]
2. 3,0 µl Magnesium-Lösung (50 mM MgCl_2)
3. 1,5 µl dNTP
4. 1,5 Units \cong 0,3 µl Taq-Polymerase
5. 33,0 µl Aqua ad injectabilia

Zu den aliquotierten externen Primern wurde die Reaktionsmischung hinzugefügt und mit zwei Tropfen Mineralöl überschichtet. Anschließend wurde die DNS hinzupipettiert und unter das Öl zentrifugiert.

Die Amplifizierung der DNS in einem Thermo-Cycler begann mit 4 min initialer Denaturierung bei 94°C , gefolgt von 35 Zyklen mit folgendem Programm: Denaturierung bei 94°C für 30 s, Primer-Anbindung bei 60°C für 60 s und Primer-Verlängerung bei 72°C für 45 s. Anschließend erfolgte eine endgültige Fragmentverlängerung für 10 min bei 72°C .

Für den internen Ansatz wurden 3 U Taq-Polymerase verwendet. Als interne Primer wurden 15 µl der einmolaren Primer CAT2 und RH1 verwendet. Mit Hilfe dieser Primer wurde eine spezifische DNS-Sequenz von 390 bp erzeugt.

Zu dem internen Ansatz wurden 15 µl des externen Ansatzes gegeben und mit folgendem Programm in 45 Zyklen vervielfältigt: Denaturierung bei 94°C für 30 s, Primer-Anbindung bei 60°C für 30 s und Primer-Verlängerung bei 72°C für 45 s. Das Programm wurde nach weiteren 10 min bei 72°C beendet.

Die amplifizierte DNS wurde mittels Elektrophorese in 2%igem Agarosegel, das mit Ethidiumbromid gefärbt worden war, durch einen UV-Transilluminator dargestellt und mittels Polaroid-Fotos dokumentiert.

2.3.10.3 Sensitivität des molekularbiologischen Erregernachweises

Nachdem die Konzentration einer *B.-h.*-Suspension des Stammes B1 kulturell bestimmt worden war, wurde deren DNS, wie für die Gewebeproben beschrieben, extrahiert, mit Hilfe der PCR vervielfältigt und elektrophoretisch dargestellt. So wurde bei Aufarbeitung der DNS mit der beschriebenen Methode eine Nachweisgrenze dieser PCR von 15 KBE pro Ansatz ermittelt.

2.3.11 Untersuchungen der zellulären Immunantwort

2.3.11.1 Gewichtsbestimmung der poplitealen Lymphknoten

Zur Beobachtung des lokalen Infektionsverlaufs wurde das Gewicht der drainierenden Lymphknoten bestimmt. Hierfür wurden die beiden poplitealen Lymphknoten entnommen und mit einer elektronischen Analysenwaage gewogen. So ergaben sich pro Tier zwei Lymphknotengewichte. Das jeweils höhere Gewicht floß in die Auswertung ein.

2.3.11.2 Histologie

Für die histologische Untersuchung wurden Lymphknoten, Leber und Milz sofort nach Entnahme für 24 h in 5%iger Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Organe nach Vorschrift histologischer Standardprotokolle in Paraffin eingebettet, 1-2 µm dick geschnitten

und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Nach dem Färben wurden die Organschnitte eingedeckt und unter einem Lichtmikroskop beurteilt.

2.3.12 Infektionsserologische Untersuchung

Von 200 µl Blut wurde das Serum abzentrifugiert und bei -70°C gelagert.

Zur Ermittlung der humoralen Immunantwort wurden jeweils vier Seren der infizierten Mäusegruppen acht Wochen p.i. und 20 Wochen p.i. untersucht. Hierfür wurde ein *B.-h.*-spezifischer IFT entsprechend den Vorschriften des Herstellers durchgeführt (*Bartonella*-Immunfluoreszenztest IgG).