Orientia tsutsugamushi Infektion in der Maus: Organtropismus und lymphozytenabhängige Immunantwort

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Matthias Hauptmann
(15.01.1982, Bünde)

Hamburg, Februar 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. B. FLEISCHER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. M. BRELOER
Tag der Disputation: 26.10.2012

Hamburg, den 11.10.2012

Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **1**

Kapitel 1: Einleitung **3**

1.1 *Orientia tsutsugamushi* **3**

1.1.1 Morphologie und Taxonomie 3

1.1.2 Lebensweise und Verbreitung 4

1.1.3 Zellbiologie 4

1.1.4 Humane Infektion – Klinik, Therapie und Epidemiologie 5

1.1.5 Natürliche Wirte und Mausmodelle 6

1.2 Die Immunreaktion gegen *Orientia tsutsugamushi* im Vergleich mit weiteren intrazellulären Erregern **7**

1.2.1 $CD4^+$ T-Zellen 8

1.2.2 $CD8^+$ T-Zellen 9

1.2.3 NK-Zellen 12

1.2.4 B-Zellen und Antikörper 13

1.2.5 Makrophagen 13

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit **15**

Kapitel 2: Material **17**

2.1 Laborgeräte **17**

2.2 Verbrauchsmaterialien **18**

2.3 Chemikalien und Reagenzien **19**

2.3.1 Reagenzien für zellbiologische Arbeiten 20

2.3.2 Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten 21

2.3.3 Reagenzien für proteinchemische Arbeiten 22

2.3.4 Antikörper 22

2.4 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen **23**

2.4.1 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen für zellbiologische und tierexperimentelle Arbeiten 24

2.4.2 Puffer und Stammlösungen für molekularbiologische Arbeiten 25

2.4.3 Puffer und Stammlösungen für proteinchemische Arbeiten 25

2.5 Nukleinsäuren **27**

2.6 Zelllinien, Bakterien und Tiere **28**

2.7 Software **28**

Kapitel 3: Methoden **29**

3.1 Zellbiologische Arbeiten **29**

3.1.1 Kultivierung von Zellen 29

3.1.2 Herstellung von infektiösen- und L929-Kontrollinokulaten 29
3.1.3 Immunfluoreszenz 30
3.1.4 Quantifizierung von infektiösen Inokulaten – *Immunofocus*-Assay 30
3.1.5 Aufreinigung von *O. tsutsugamushi* aus Zellkulturen 31
3.1.6 Herstellung und Quantifizierung von *O. tsutsugamushi* Antigen 31
3.1.7 Präparation von Zellsuspensionen aus Mausorganen 32
3.1.8 Zellzahlbestimmung 32
3.1.9 Durchflusszytometrie 32
3.1.10 *in vitro* Restimulation 33
3.1.11 Transduktion von 232-Makrophagen mit lentiviralen Partikeln 34
3.1.12 Infektion, Stimulation und Inhibition antibakterieller Effektormechanismen von 232-Makrophagen 34

3.2 Molekularbiologische Arbeiten 35
3.2.1 DNA-Aufreinigung 35
3.2.2 Bestimmung von DNA-Konzentrationen 35
3.2.3 *Realtime*-PCR (qPCR) 36
3.2.4 Herstellung lentiviraler Partikel 38

3.3 Biochemische Arbeiten 39
3.3.1 Zytokin-ELISA 39
3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot 39

3.4 Tierexperimentelle Arbeiten 40
3.4.1 Infektion und Injektion von L929-Kontrollzellen 41
3.4.2 Injektion von Antikörpern und Peptiden 41
3.4.3 Blutabnahme für die qPCR 41
3.4.4 Präparation von Organen 41
3.4.5 Überlebenskurven 43

3.5 Darstellung und Statistik 43

Kapitel 4: Ergebnisse 44

4.1 Etablierung und Charakterisierung eines Infektionsmodells 44
4.1.1 Etablierung eines Infektionsmodells 44
4.1.2 Entwicklung einer *O. tsutsugamushi* spezifischen Multikopien-qPCR 46
4.1.3 Infektionsverlauf 49
4.1.4 Histopathologie 50
4.1.5 Erregerquantifizierung in *ex vivo* isolierten Zellpopulationen 52

4.2 Charakterisierung der lymphozytären Immunreaktion gegen *O. tsutsugamushi* 54
4.2.1 Lymphozytäre Zusammensetzung in Milz, Lymphknoten und Lunge 54
4.2.2 Relevanz von $CD8^+$ T-Zellen 57
4.2.3 $CD8^+$ T-Zell Epitope 59

4.3 Funktionelle Charakterisierung von Lymphozyten insbesondere hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion 63
4.3.1 Proliferationspotenzial von Lymphozyten 63
4.3.2 Regulation von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen in der Lunge 64

4.3.3 Expression von Zytokinen 65
4.3.4 Die Bedeutung von IFN-γ für die Kontrolle der *O. tsutsugamushi* Infektion in BALB/c Mäusen 72

Kapitel 5: Diskussion 75

5.1 Infektionsmodell, Zielorgane und Zielzellen 75
5.2 Lymphozytäre Immunreaktion 78
5.3 Funktionelle Charakterisierung von Lymphozyten 81
5.4 IFN-γ-abhängige Effektormechanismen von Makrophagen 84

Literaturverzeichnis 86

Abkürzungsverzeichnis

1-MT	1-Methyltrypthophan
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle (*antigen presenting cell*)
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*)
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (*cluster of differentiation*)
cpm	Zerfälle pro Minute (*counts per minute*)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTH	Immunreaktion des verzögerten Typs *(delayed type hypersensitivity)*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunoadsorptionstest (*enzyme-linked immunsorbent assay*)
FCS	Fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
IDO	Indolamindioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase *(inducible nitric oxide synthase)*
L. monocytogenes	*Listeria monocytogenes*
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LeGO-Vektor	lentiviraler Vektor (*lentiviral gene ontology vector*)
LK	Lymphknoten
LLO	Listeriolysin O
M. tuberculosis	*Mycobacterium tuberculosis*
MHC-I /MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*) Klasse I / Klasse II
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle (*natural killer cell*)

NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin
O. tsutsugamushi, *O. tsu*	*Orientia tsutsugamushi*
Ova	Ovalbumin
p	Wahrscheinlichkeit
p.i.	Nach der Infektion (*post infectionem*)
PAMP	Pathogen assoziiertes molekulares Muster (*pathogen associated molecular pattern*)
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PE	Phycoerythrin
PerCP/Cy5.5	Peridinin Chlorophyll Protein / Cyanin 5.5
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an H_3O^+-Ionen (*potentia hygrogenii*)
qPCR	quantitative PCR
R. conorii	*Rickettsia conorii*
RNI	Reaktive Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung *(standard deviation)*
SEM	Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*)
sfu	*spot forming unit*
Th-Zelle	T-Helferzelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
β_2m	β2-Mikroglobulin

Zusammenfassung

Orientia tsutsugamushi (*O. tsutsugamushi*) ist ein obligat intrazelluläres Bakterium, das im Zytoplasma der Wirtszellen repliziert. Der Erreger ist vor allem in ländlichen Regionen Süd-Ost Asiens verbreitet und verursacht beim Menschen das sog. Tsutsugamushi-Fieber (engl. *scrub typhus*). Während die Infektion gut auf antibiotische Therapie anspricht, verläuft sie unbehandelt in 4 – 40 % der Fälle tödlich [4].

Welche Mechanismen für eine protektive Immunantwort notwendig sind oder eine Immunpathologie verursachen, ist bisher nur unvollständig verstanden. Während Forschungen der 1970-1980er Jahre zeigten, dass immunologischer Schutz gegen *O. tsutsugamushi* T-Zell-vermittelt ist [5, 6], wurden Subpopulationen von T-Zellen während der Infektion bis heute kaum differenziert analysiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Immunantwort gegen *O. tsutsugamushi* mit modernen Methoden zu untersuchen. Dazu wurde zunächst erfolgreich ein stabiles Infektionsmodell etabliert, bei dem BALB/c Mäuse subkutan mit infizierten L929 Zellen inokuliert werden. Die Infektion führt ab dem zwölften Tag nach der Infektion zu der Ausbildung von Krankheitssymptomen, repräsentiert durch die Fellbeschaffenheit der Mäuse. Nach ca. drei Wochen sind die Krankheitssymptome überwunden.

Um die Ausbreitung des Erregers genau nachvollziehen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine besonders sensitive quantitative PCR entwickelt, die multiple Allele eines *O. tsutsugamushi* Gens amplifiziert. Mit Hilfe dieser PCR konnte gezeigt werden, dass der Erreger zuerst den drainierenden Lymphknoten befiel, sich danach aber systemisch ausbreitete, wobei die höchste Parasitenlast in der Lunge gemessen wurde. Auch immunhistologisch konnten antigenpositive Erregerstrukturen in der Lunge nachgewiesen werden und etwa drei Wochen nach der Infektion entwickelte sich eine chronische Bronchopneumonie.

Bezüglich der Immunantwort gegen *O. tsutsugamushi* konnte mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden gezeigt werden, dass $CD8^+$ T-Zellen massiv expandierten und einen aktivierten Phänotyp aufwiesen. Die Depletion von $CD8^+$ T-Zellen während der

Infektion sowie die Infektion von β2-Mikroglobulin-defizienten Mäusen, die keine $CD8^+$ T-Zellen entwickeln, führten zu erhöhter Erregerlast im peripheren Blut sowie zu vermindertem Überleben gegenüber den Kontrollen. Funktionell zeigten Lymphozyten eine robuste IFN-γ Expression. Die Bedeutung von IFN-γ für die Erregerabwehr wurde durch *in vivo* Neutralisierung im Laufe einer etablierten *O. tsutsugamushi* Infektion untersucht. Die Erregerlast in derart IFN-γ-depletierten Mäusen war signifikant höher als in den Kontrolltieren. Durch *in vitro* Versuche konnte zudem gezeigt werden, dass eine Aktivierung durch IFN-γ für eine effektive Erregerbekämpfung in Makrophagen verantwortlich ist. Dabei hing die Erregerbekämpfung von der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (*iNOS*) ab. Während $CD8^+$ T-Zellen *in vivo* expandierten und große Mengen IFN-γ produzierten, war *in vitro* eine verminderte Proliferation sowie eine verminderte Expression der T-Zell Rezeptor assoziierten Moleküle CD3 und CD8 zu sehen. Dieser T-Zellphänotyp könnte im Zusammenhang mit einer Erregerpersistenz stehen, die im Menschen und in Mausmodellen bereits gezeigt wurde [7-10].

Es wurde in dieser Arbeit also erfolgreich ein *O. tsutsugamushi* Mausmodell etabliert. Die Lunge wurde als eines der Hauptzielorgane des Erregers identifiziert. Damit übereinstimmend wurde eine chronische Bronchopneumonie gezeigt. Das Mausmodell spiegelt hiermit einen wichtigen Aspekt der humanen Infektion wider. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass $CD8^+$ T-Zellen und IFN-γ zentrale Mechanismen einer effektiven Immunantwort gegen *O. tsutsugamushi* sind.

Die Daten tragen somit zu einem genaueren Verständnis der Immunantwort gegen *O. tsutsugamushi* und der Verbreitung im Wirtsorganismus bei. Zudem wurden mögliche Mechanismen aufgezeigt, die mit einer chronischen Erregerpersistenz in Verbindung stehen könnten.

Kapitel 1: Einleitung

1.1 *Orientia tsutsugamushi*

Orientia tsutsugamushi (*O. tsutsugamushi*) ist ein obligat intrazellulär replizierendes Bakterium aus der Familie der Rickettsiaceae und der Erreger des sog. Tsutsugamushi-Fiebers (engl.: *scrub typhus*), welches vor allem in ländlich geprägten Regionen Süd-Ost-Asiens verbreitet ist.

1.1.1 Morphologie und Taxonomie

Das Bakterium hat eine kokkoide Form mit einer Breite von etwa 0,5 µm und einer Länge von 1,2-3,0 µm [11]. Als Vertreter der Rickettsiaceae wird *O. tsutsugamushi* den gramnegativen Bakterien zugeordnet, der Zellwandaufbau ist jedoch atypisch. Die charakteristische Doppelmembran ist vorhanden, aber die typischen Zellwandbestandteile Lipopolysaccharid (LPS) und Peptidoglycan konnten biochemisch nicht nachgewiesen werden [12]. Molekularbiologische Untersuchungen bestätigten das Fehlen notwendiger Enzyme für die LPS-Synthese [13].

Hayashi isolierte den Erreger erstmals 1920 in Japan. Aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten mit Protozoen schlug er den Namen *Theilleria tsutsugamushi* vor [14]. Im Jahre 1930 klassifizierten Nagayo *et al.* den Erreger als Vertreter der Rickettsien und schlugen den Namen *Rickettsia orientialis* vor [15]. Zu Ehren beider Entdecker setzte sich ab 1931 vorerst der Name *Rickettsia tsutsugamushi* durch [16]. Aufgrund von 16S rRNA-Analysen und der beschriebenen morphologischen Besonderheiten des Zellwandaufbaus wurde der Erreger 1995 einem eigenen Genus innerhalb der Familie Rickettsiaceae zugeordnet und heißt seither *Orientia tsutsugamushi* [17].

Das *O. tsutsugamushi* Genom der Stämme Ikeda und Boryong wurde vollständig sequenziert [18, 19]. Es hat eine Größe von 2008 bzw. 2127 kbp und ist damit deutlich größer als die typischen Genomgrößen anderer Vertreter der Rickettsiaceae. Weite Teile des Genoms bestehen aus repetitiven Sequenzen mobiler genetischer Elemente [19].

1.1.2 Lebensweise und Verbreitung

O. tsutsugamushi wird von Laufmilben der Gattung *Leptotrombidium* übertragen. Das Bakterium persistiert in den Milben und wird transovarial auf die Nachkommen übertragen [20-25], daher stellen Laufmilben auch ein Reservoir für *O. tsutsugamushi* dar. Während der Blutmahlzeit infizierter Milbenlarven wird der Erreger mit dem Speichel der Milben in die Haut der Wirte injiziert [26]. Die natürlichen Wirte von *O. tsutsugamushi* sind vor allem Nagetiere, aber auch Menschen können befallen werden und entwickeln das Tsutsugamushi-Fieber.

Der Lebensraum des Erregers richtet sich nach dem Lebensraum der Laufmilben. Sie befinden sich in Gebieten sekundärer Vegetation mit hohem Gras oder Unterholz (engl.: *scrub*) [27]. Innerhalb der letzten Jahre wurden einzelne *Orientia* Infektionen auch aus anderen Regionen der Welt berichtet [28-30].

1.1.3 Zellbiologie

In Patienten konnte *O. tsutsugamushi* bisher in Monozyten, Makrophagen, Kupffer-Zellen, Dendritischen Zellen, polymorphkernigen Zellen, Endothelzellen, Epithelzellen der Niere, Hepatozyten und Herzmuskelzellen nachgewiesen werden [31-36]. Die Zielzellen in Nagetieren sind bisher weniger untersucht. Kundin *et al.* sowie Murata *et al.* berichteten, dass nach intraperitonealer Infektion von Mäusen vor allem Mesothelzellen sowie Bindegewebszellen und Exsudatzellen betroffen sind. Nach subkutaner Infektion sind vor allem Kupffer-Zellen, Gewebsmakrophagen und Bindegewebszellen mesothelialem Ursprungs sowie Endothelzellen der Sinus von Milz- und Lymphknoten infiziert [37, 38].

Intrazellulär liegt *O. tsutsugamushi* zytoplasmatisch vor. Die Replikation erfolgt durch binäre Teilung [1], dabei dauert ein Replikationszyklus in L929 Zellen etwa 9 h [4].

Die Zell-zu-Zell Ausbreitung erfolgt durch *budding* der Bakterien an der äußeren Zellmembran der Wirtszelle [1] (Abb. 1.1.1 A). Während der natürlichen Infektion von Mäusen mit infizierten Milben konnte gezeigt werden, dass *O. tsutsugamushi* nach Austritt aus der Speicheldrüse der Milben außerhalb von Zellen, jedoch von einer dritten Membran umgeben vorliegt [26]. In der Zellkultur konnte *O. tsutsugamushi* in elektronenmikroskopischen Studien außerhalb der Wirtszellen umgeben von zwei oder auch von drei Membranen gezeigt werden. Die Studien zeigen, dass *O. tsutsugamushi* in beiden Formen Wirtszellen penetrieren kann. Unabhängig vom Eintrittsweg wurde von beiden Gruppen jedoch ein Austritt von *O. tsutsugamushi* in das Zytoplasma der Wirtszellen gezeigt [1, 3] (Abb. 1.1.1 B, C). Der ge-

samte Penetrationsprozess einschließlich des Austritts aus dem Phagosom sei innerhalb von 10 bis 20 min abgeschlossen [3]. Der Mechanismus des Austritts aus dem Phagosom, ist bisher ungeklärt. Während für *Rickettsia prowazekii* gezeigt wurde, dass Pld (Phospholipase D) für die Lyse der Wirtszellmembran verantwortlich ist [39], wurde ein homologes Gen in *O. tsutsugamushi* nicht gefunden [18].

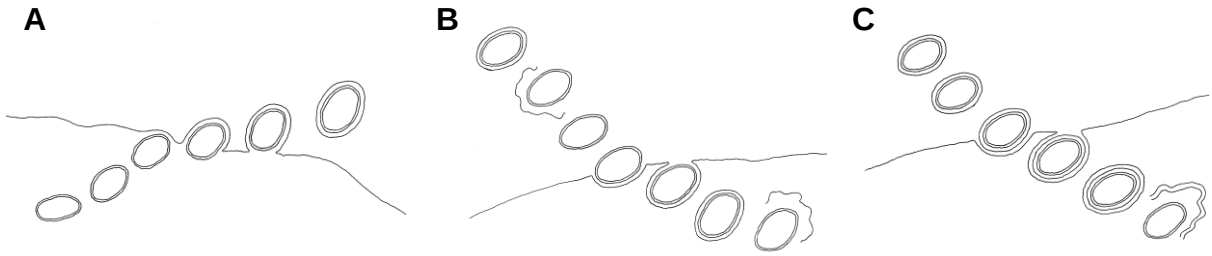


Abb. 1.1.1: *budding* und Penetration.
O. tsutsugamushi verlässt die Wirtszelle durch einen *budding*-Prozess [1] **(A)**. Die Infektion von Zielzellen erfolgt entweder durch Lyse der Wirtszellmembran im Interstitium, anschließender Penetration der Zielzelle und zuletzt Lyse der neu gewonnenen Wirtszellmembran [3] **(B)**, oder durch direkte Penetration im umhüllten Stadium und anschließend gleichzeitiger Lyse von zwei Wirtszellmembranen [1] **(C)**.

1.1.4 Humane Infektion – Klinik, Therapie und Epidemiologie

Menschen können während des Bisses infizierter Laufmilben mit *O. tsutsugamushi* infiziert werden und das Tsutsugamushi-Fieber entwickeln.

Klinik

Nach dem Biss durch eine infizierte Milbe bildet sich um die Bissstelle eine kutane Nekrose, die als Eschar bezeichnet wird [14]. Klinische Symptome beginnen nach einer Inkubationszeit von ca. 10-12 Tagen mit hohem Fieber, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Husten und gastrointestinalen Symptomen [40-42]. Häufig wurden regionale oder generalisierte Lymphadenopathien sowie Splenomegalien berichtet [40, 41, 43]. Fünf bis acht Tage nach dem Einsetzen von Fieber kann sich ein makulärer oder makulopapulärer Hautausschlag entwickeln [41, 43]. Der Husten geht oft einher mit pulmonalen Infiltraten die röntgenologisch gezeigt werden können [42]. Häufig entwickelt sich daraus das Vollbild eines akuten respiratorischen Syndroms [44]. Das pathologische Korrelat ist eine interstitielle Pneumonie mit lymphozytären Infiltraten [33]. Neben der Lungenpathologie wurden auch perivaskuläre Entzündungen des Herzens [45], des Gehirns [46, 47] sowie seltener der Leber [32, 48] und der Niere [36] beobachtet [42]. Nach der Akutphase der Erkrankung und antibiotischer Therapie

kann der Erreger wenigstens über mehrere Monate im Gewebe und im peripheren Blut der Patienten persistieren [7, 8].

Diagnose und Therapie

Die Diagnose einer *O. tsutsugamushi* Infektion erfolgt aufgrund des charakteristischen Eschars sowie serologischer Tests [49] und erregerspezifischen PCRs [50-53]. Unbehandelt kann eine *O. tsutsugamushi* Infektion tödlich verlaufen. Vor der breiten Verfügbarkeit von Antibiotika betrug die Letalität von *O. tsutsugamushi* Infektionen bis zu 40 %, war jedoch in hohem Maße Stamm-abhängig [4]. Verschiedene Antibiotika können gegen *O. tsutsugamushi* eingesetzt werden, dazu gehören Chloramphenicol, Tetrazyklin-Antibiotika, Makrolide, Quinolone und Rifampicin. Die beste Wirksamkeit zeigt Doxyzyklin [54]. β-Lactam-Antibiotika sind nicht wirksam, weil die Zielstruktur Peptidoglycan kein Bestandteil der Zellwand von *O. tsutsugamushi* ist [12]. Antibiotikaresistenzen sind selten, Berichte aus Vietnam und Thailand zeigen jedoch eine verminderte Wirksamkeit von Doxyzyklin [55-57]. Impstoffe bieten bisher nur einen kurzzeitigen und auf wenige Serotypen beschränkten Immunschutz gegen *O. tsutsugamushi* [58].

1.1.5 Natürliche Wirte und Mausmodelle

Kleine Säugetiere sind die natürlichen Wirte von *O. tsutsugamushi*. In einer Studie in einem thailändischen Endemiegebiet zeigte sich, dass in der Wildnis Ratten die häufigsten Träger von *O. tsutsugamushi* waren [59]. Frances *et al.* sowie Lurchachaiwong *et al.* zeigten, dass die murine Infektion von *O. tsutsugamushi* durch den Biss infizierter Milben meistens letal verläuft [60, 61]. Ratten dagegen überleben die Infektion und Erreger sind für acht Wochen in der Milz oder Leber nachweisbar [61].

Groves *et al.* verglichen die Virulenz verschiedener *O. tsutsugamushi* Stämme bei unterschiedlichen Infektionsrouten in verschiedenen Mausstämmen. So ist die intraperitoneale Infektion von BALB/c Mäusen mit dem Karp Stamm, sowie von C3H/He Mäusen mit dem Gilliam Stamm letal, während die intraperitoneale Infektion von BALB/c Mäusen mit dem Gilliam Stamm nicht-letal ist. Die subkutane Infektion von BALB/c Mäusen mit dem Gilliam oder Karp Stamm sowie von C3H/He Mäusen mit dem Gilliam Stamm sind nicht-letal [62].

Wie im Menschen kann der Erreger auch im Mausmodell nach dem Abklingen kinischer Symptome im Blut und im Gewebe persistieren. Fox *et al.* konnten vitale Erreger in Blut, Leber, Hirn und Nieren von Mäusen 610 Tage nach der Infektion mit *O. tsutsugamushi* nach-

weisen [9]. Shirai *et al.* konnten 565 Tage *post infectionem* (p.i.) durch die Gabe von Zyklophosphamid eine Reaktivierung der Erkrankung herbeiführen [10].

Histologisch präsentiert sich eine murine Infektion mit *O. tsutsugamushi* mit interstitiellen Entzündungen in einer Vielzahl von Organen. Aktive Gefäßentzündungen wurden jedoch bisher nicht nachgewiesen [63], ebenso wurde die Ausbreitung des Erregers in der Maus bisher nicht quantitativ untersucht. Um Mausmodelle mit der humanen Pathologie zu vergleichen werden weitere Kenntnisse über die Erregerausbreitung sowie histopathologische Reaktionen in der Maus benötigt.

1.2 Die Immunreaktion gegen *Orientia tsutsugamushi* im Vergleich mit weiteren intrazellulären Erregern

Das Immunsystem hat verschiedene Strategien entwickelt um unterschiedliche Erreger effektiv zu bekämpfen. Intrazelluläre Erreger werden durch $CD4^+$ Th1 bzw. $CD8^+$ Tc1 Zellen bekämpft. Beide Zelltypen zeichnen sich durch die Produktion von IFN-γ aus. Zu den intrazellulären Erregern gehören Vertreter der Protozoa, Bakterien und Viren. Protozoa wie *Leishmania* spec. und viele intrazelluläre Bakterien wie *Mycobacteria* spec. und *Chlamydia* spec. liegen intrazellulär in einer membranumschlossenen Vakuole vor. Die meisten Viren sowie einige intrazelluläre Bakterien wie *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) und alle Vertreter der Familie Rickettsiaceae liegen frei im Zytoplasma vor.

Für die Abwehr der unterschiedlichen Typen intrazellulärer Erreger ist die Bedeutung von Makrophagen, $CD4^+$ sowie $CD8^+$ T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen besonders gut untersucht. Ihre Funktionen werden im Folgenden näher erläutert. Zusätzlich können aber auch weitere Zelltypen, wie NKT- und γδ-T-Zellen eine Rolle spielen.

Nach einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* etabliert sich ein Immungedächtnis, welches jedoch nur einen zeitlich begrenzten und nur teilweise auch gegen heterologe Stämme gerichteten Schutz gegen Reinfektion gewährleistet [64]. Bereits 1976 konnten Shirai *et al.* zeigen, dass T-Zellen einen bedeutenden Anteil am Immungedächtnis haben [5]. Weitere Untersuchungen bestätigten die Bedeutung von T-Zellen auch in der primären Infektion [6]. Die Produktion von IFN-γ von T-Zellen in *O. tsutsugamushi* infizierten Mäusen wurde von Palmer *et al.* beschrieben [65, 66]. Nacy *et al.* erkannten die Bedeutung von IFN-γ für die effektive Bekämpfung von *O. tsutsugamushi* durch Makrophagen [67, 68]. Eine differenzierte Betrachtung der Rolle von T-Zell Subpopulationen wurde bisher jedoch kaum vorgenommen.

Vorhandene Untersuchungen zur Immunreaktion gegen *O. tsutsugamushi* basieren größtenteils auf den Methoden der 1970er bis 1980er Jahre, doch erst die modernen Methoden wie qPCR und Mehrfarben-Durchflusszytometrie sowie die breite Verfügbarkeit von rekombinanten Mausstämmen und die Möglichkeit mit monoklonalen Antikörpern Zellpopulationen zu depletieren oder Zytokine zu neutralisieren ermöglichen eine systematische Aufklärung der Immunreaktion intrazellulärer Erreger. Die Erforschung von verschiedenen Modellerregern wie *Leishmania* spec., *L. monocytogenes* oder von Viren wie LCMV ist deutlich weiter vorangeschritten als die Erforschung von *O. tsutsugamushi* und anderen Vertretern der Rickettsiaceae.

1.2.1 $CD4^+$ T-Zellen

Für die Initiation einer $CD4^+$ T-Zell Antwort sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells, APCs*) entscheidend. Die wichtigsten *APCs* sind in diesem Zusammenhang dendritische Zellen. Sie endozytieren in allen Geweben unspezifisch extrazelluläre Moleküle, Partikel und Zellen und führen Peptidbruchstücke dem MHC-II-Präsentationsweg zu. Erkennen dendritische Zellen dabei konservierte Pathogenstrukturen (*PAMP*s), so exprimieren sie kostimulatorische Moleküle und Zytokine.

$CD4^+$ T-Zellen exprimieren einen T-Zell Rezeptor (TCR), welcher auf MHC-II Peptidkomplexe restringiert ist. Erkennen $CD4^+$ T-Zellen mit ihrem T-Zell Rezeptor einen spezifischen MHC-II Peptidkomplex und zusätzlich kostimulatorische Signale auf einer *APC*, so werden die $CD4^+$ T-Zellen aktiviert. Das bedeutet, dass sie proliferieren und Zytokine sowie das Oberflächenmolekül CD40L exprimieren. Das Reaktionsmuster der $CD4^+$ T-Zellen ist dabei abhängig von dem Zytokinprofil welches die *APC* exprimiert. Erkennen die $CD4^+$ T-Zellen IL-12, so polarisieren sie zu Th1-Zellen, welche IFN-γ exprimieren. Die Funktionen dieser Zellen sind die Vermittlung von T-Zell Hilfe für die B-Zell-Differenzierung, $CD4^+$ T-Zell Hilfe für die Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen und die IFN-γ vermittelte Makrophagenaktivierung.

Im Modell der murinen Leishmaniose wurde gezeigt, dass $CD4^+$ T-Zellen den Ausgang der Infektion determinieren [69]. Während $CD4^+$ T-Zellen in suszeptiblen BALB/c Mäusen kein IFN-γ, dafür aber IL-4 produzieren, etablieren C57BL/6 und CBA Mäuse eine schützende Th1-Antwort, welche durch Produktion von IFN-γ gekennzeichnet ist. $CD4^+$ T-Zellen in BALB/c Mäusen nehmen einen regulatorischen Phänotyp an und regulieren die protektive Th1-Antwort aktiv herunter [70].

Die Rolle von $CD4^+$ T-Zellen für die Immunabwehr gegen *O. tsutsugamushi* ist weitgehend ungeklärt. Der Nachweis von IFN-γ in Kulturen *ex vivo* isolierter Splenozyten [65, 66] sowie der Nachweis von Immunreaktionen des verzögerten Typs *(delayed type hypersensitivity; DTH*) Reaktionen [6] in *O. tsutsugamushi* infizierten Mäusen lässt eine Th1-Polarisierung vermuten. Damit ist jedoch weder gezeigt, dass $CD4^+$ T-Zellen selbst signifikante Mengen IFN-γ produzieren, noch dass sie für den Immunschutz entscheidend sind.

1.2.2 $CD8^+$ T-Zellen

$CD8^+$ T-Zellen sind wichtige Effektorzellen des adaptiven Immunsystems gegen intrazelluläre Erreger. Sie erkennen infizierte Zellen mit dem TCR über MHC-I Peptidkomplexe auf den Zielzellen und reagieren mit Zytokinproduktion und zytotoxischen Mechanismen die zur Lyse der infizierten Zellen führen.

Die Bedeutung von $CD8^+$ T-Zellen wurde in verschiedenen intrazellulären Infektionsmodellen gezeigt. Leishmanien werden in suszeptiblen BALB/c Mäusen erfolgreich durch $CD8^+$ T-Zellen bekämpft, wenn regulatorische T-Helfer-Zellen eliminiert werden [71]. Die Depletion von $CD8^+$ T-Zellen führt zu erhöhter Erregerlast bei der murinen *Toxoplasma gondii* Infektion [72]. Des Weiteren zeigte die Depletion von $CD8^+$ T-Zellen, sowie die Infektion von $CD8^+$ T-Zell-defizienten β2-Mikroglobulin *knockout* ($\beta_2m^{-/-}$) Mäusen, dass $CD8^+$ T-Zellen die Erregerlast in der murinen Listeriose eindämmen können [73, 74]. Insbesondere für einen langanhaltendem Immunschutz werden im murinen Listerienmodell $CD8^+$ T-Zellen verantwortlich gemacht [75]. Allerdings sind $CD8^+$ T-Zellen nicht für die Abwehr von allen intrazellulären Erregern entscheidend. Wang *et al.* zeigten, dass $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse eine *L. major* Infektion ebenso schnell überwinden wie die WT-Kontrollen [76]. Auch bei dem fakultativ zytoplasmatisch replizierenden Bakterium *Francisella tularensis* [77] (*Review*: [78]) und dem Vaccinia-Virus [79, 80] wurde gezeigt, dass $CD8^+$ T-Zellen entbehrlich sein können.

Präsentation von $CD8^+$ T-Zell Epitopen

Jede kernhaltige Zelle exprimiert MHC-I Moleküle an ihrer Oberfläche die der Präsentation von zytoplasmatischen Peptiden dienen. Bei diesem Prozess wird nicht zwischen zelleigenen und zellfremden Peptiden, die durch Erreger in das Zytoplasma gelangt sind, unterschieden. Für die Bereitstellung von Peptidepitopen werden Proteine, die im Zytosol zugänglich sind, zunächst polyubiquitinyliert. Am Lysin 48 polyubiquitinylierte Proteine werden im Proteasom zu Peptiden degradiert. Stimulation der Zellen mit IFN-γ verändert die Funktion des Proteasoms und fördert die Bildung eines Peptidspektrums, das aufgrund von hydrophoben

oder basischen Aminosäuren am Carboxylterminus für die Präsentation in MHC-I Molekülen besonders gut geeignet ist. MHC-I Moleküle werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und mit Peptiden beladen, die aus dem Zytoplasma über den Antigenpeptid-Transporter (*transporter associated with antigen processing*; TAP-Transporter) ins ER transferiert werden. Peptidbeladene MHC-I Moleküle werden zur Zelloberfläche transportiert, wo sie für die Erkennung durch $CD8^+$ T-Zellen zur Verfügung stehen.

Immundominante $CD8^+$ T-Zell Epitope wurden bereits bei einer Reihe von Infektionsmodellen beschrieben. So enthalten die Proteine Listeriolysin (LLO) und p60 bei *L. monocytogenes* [81] sowie das „*outer membrane protein B*“ (*OmpB*) bei *Rickettsia conorii* (*R. conorii*) immundominante $CD8^+$ T-Zell Epitope [82]. Ein wichtiger Immunevasionsmechanismus des Herpes simplex virus ist die Blockade des TAP-Transporters [83]. So werden keine MHC-I Peptidkomplexe auf der Oberfläche infizierter Zellen präsentiert und $CD8^+$ T-Zellen können diese Zellen nicht erkennen. Andere Viren, wie HIV, entkommen der $CD8^+$ T-Zell Antwort durch hohe Mutationsraten, wodurch ständig Virusvarianten mit veränderten Epitopen entstehen, die nicht mehr von bis dahin reaktiven $CD8^+$-T-Zellen erkannt werden (*Review*: [84]).

Initiation einer $CD8^+$ T-Zell Antwort

Wie bei der Initiation einer $CD4^+$ T-Zell Antwort sind dendritische Zellen auch für die Initiation einer $CD8^+$ T-Zell Antwort entscheidend [85]. Dies ist möglich weil dendritische Zellen neben der unter 1.2.1 beschriebenen klassischen Präsentation Epitope phagozytierter Strukturen auch dem MHC-I Präsentationsweg zugänglich machen können [86]. Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Für die Etablierung von $CD4^+$ T-Zell abhängigen $CD8^+$ T-Zell Reaktionen ist eine Aktivierung der dendritischen Zellen durch Ligation von CD40 durch CD40L nötig, welches von $CD4^+$ T-Zellen nach Aktivierung exprimiert wird [87].

Viele Erreger können durch eine direkte Aktivierung von *APC*s eine $CD8^+$ T-Zell Antwort ohne $CD4^+$ T-Zell Hilfe initiieren [87-89]. Für die Etablierung einer $CD8^+$ T-Zell Antwort gegen Proteinantigene ohne inflammatorische Stimuli ist jedoch Hilfe durch $CD4^+$ T-Zellen erforderlich [87, 90]. Die Notwendigkeit von $CD4^+$ T-Zellen für die Kontrolle chronischer Infektionen und für Gedächtnisantworten wird kontrovers diskutiert und scheint pathogen- bzw. modellabhängig zu sein. Chronische LCMV-Infektionen werden nur durch $CD8^+$ T-Zell Antworten mit $CD4^+$ T-Zell Hilfe erfolgreich bekämpft [91]. Im Modell der murinen Listeriose wurde außerdem gezeigt, dass für die Etablierung einer $CD8^+$ T-Zell Gedächtnisantwort Hilfe durch $CD4^+$ T-Zellen benötigt wird [92]. Marzo *et al.* berichteten jedoch, dass

eine Gedächtnisantwort gegen das Vesicular stomatitis virus (VSV) nicht $CD4^+$ T-Zell abhängig ist [93].

Effektormechanismen

Die Effektormechanismen von $CD8^+$ T-Zellen können im Wesentlichen in kontaktabhängige Lyse von infizierten Zellen und zytokinvermittelte Mechanismen eingeteilt werden.

Die kontaktabhängige Lyse kann durch eine Ligation von Fas (CD95) durch das $CD8^+$ T-Zell Oberflächenmolekül FasL (CD178) erfolgen. Fas wird konstitutiv auf nahezu allen Zelltypen exprimiert. Die Bindung von FasL vermittelt eine Apoptoseinduktion in den Zielzellen. Der Mechanismus spielt vor allem im Zusammenhang mit Immunregulation und Tumorabwehr eine Rolle und wurde bisher selten in einen Zusammenhang mit einer Erregerabwehr gebracht (*Review*: [94]). Ein weiterer Mechanismus der kontaktabhängigen Lyse ist die Sekretion von zytotoxischen Granula. Die Granula enthalten das porenbildende Toxin Perforin, sowie Granzyme und Serglycin. Perforin ist vermutlich für die Verbringung von Serglycin/Granzym Komplexen in die Zielzellen verantwortlich. In der Zielzelle können Granzyme dann eine Apoptose einleiten was zur Lyse der Zellen führt [95] (*Review*: [96]).

Eine Lyse der infizierten Zellen kann zur Freisetzung der intrazellulären Erreger führen, die jedoch nicht notwendigerweise die erfolgreiche Bekämpfung des Erregers zur Folge hat. Die Mechanismen die zur Abtötung der Erreger führen sind bisher wenig untersucht und abhängig von der Erregerspezies sowie den gewählten experimentellen Bedingungen. Einige intrazelluläre Erreger wie *L. monocytogenes* [97] (murin) und *M. tuberculosis* [98] (human) sterben während der $CD8^+$ T-Zell vermittelten Lyse der Wirtszellen. Möglicherweise sind bakterizide bzw. toxische Substanzen der Granula, wie z.B. Granulysin [99], dafür verantwortlich. Diese Hypothese wird durch Experimente von Stenger *et al.* gestützt, die zeigen, dass die Erregerlast von *M. tuberculosis* infizierten Makrophagen sinkt wenn die Zellen durch Perforin-abhängige Mechanismen getötet werden, nicht jedoch, wenn die Zellen durch FasL-abhängige Mechanismen getötet werden [98]. Andere Erreger können die Zelllyse überleben. Die so freigesetzten Erreger können dann sekundär von Makrophagen aufgenommen und eliminiert werden [100]. Die Produktion von Zytokinen durch $CD8^+$ T-Zellen könnte in diesen Fällen für die Aktivierung von Makrophagen in unmittelbarer Nähe und somit für die schlussendlich doch erfolgreiche Eliminierung der Erreger entscheidend sein (*Review*: [101]).

$CD8^+$ T-Zellen können auch durch zytokinvermittelte Mechanismen die Abtötung von Erregern bewirken. $CD8^+$ T-Zellen die IFN-γ produzieren werden in Anlehnung an die Nomenkla-

tur bei T-Helferzellen als Tc1-Zellen bezeichnet [102]. Bei HBV sind IFN-γ oder TNF-α und nicht die zytotoxische Aktivität für die Erregerbekämpfung entscheidend [103]. Auch im Modell der murinen Listeriose wurde gezeigt, dass die Produktion von TNF-α durch $CD8^+$ T-Zellen für einen Immunschutz nach adoptiven Transfer von antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen verantwortlich ist [104]. Ein zentraler Effektormechanismus von $CD8^+$ T-Zellen besteht in der Aktivierung von Makrophagen durch IFN-γ [100]. Auch TNF-α kann an der Aktivierung von Makrophagen beteiligt sein oder Phagozyten an den Infektionsherd rekrutieren [105].

1.2.3 NK-Zellen

NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie exprimieren eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren.

Zwei Typen von Rezeptoren sind für zellkontaktabhängige Effektormechanismen wichtig. Während inhibierende Rezeptoren MHC-Peptidkomplexe binden, erkennen aktivierende Rezeptoren zelluläre Stresssignale wie das Molekül *MICA* (MHC class I chain-related A). Wenn die Summe der aktivierenden Liganden gegenüber inhibierenden Liganden überwiegt werden NK-Zellen aktiviert und können die Zielzellen lysieren. Daher sind NK-Zellen entscheidend bei der Immunabwehr gegen Tumore oder Erreger, die in der Lage sind die Expression von MHC-Molekülen zu reduzieren mit dem Ziel einer Erkennung durch T-Zellen zu entgehen. Eine verminderte Expression von MHC-I Molekülen wurde bereits in verschiedenen Virus-Infektionen gezeigt [106, 107].

Außerdem exprimieren NK-Zellen F_c-Rezeptoren mit denen sie durch Antikörper markierte Zellen erkennen. Dies befähigt sie dazu Zellen anzugreifen, die mit einem intrazellulären Erreger infiziert sind und Erreger-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Da dieser Mechanismus von spezifischen Antikörpern abhängt, die erst während der adaptiven Immunantwort produziert werden, kann er erst in der späten Phase einer akuten Infektion oder in sekundären Infektionen eine Bedeutung haben.

NK-Zellen können aber auch durch lösliche Faktoren wie IL-12 zur Produktion von IFN-γ angeregt werden. Dieser Mechanismus wurde unter anderem für das murine Cytomegalievirus (MCMV), das Influenza-Virus und *L. monocytogenes* gezeigt [108-111] (*Review*: [112]).

1.2.4 B-Zellen und Antikörper

B-Zellen werden aktiviert wenn sie mit ihrem spezifischen B-Zellrezeptor Antigene erkennen. Dieser Prozess kann T-Zell abhängig oder T-Zell unabhängig ablaufen. Die Hilfe von aktivierten $CD4^+$ T-Zellen ist nötig damit B-Zellen bei der Erkennung von singulären Epitopen aktiviert werden. Wird der B-Zellrezeptor durch repetitive Epitope (i.d.R. von Zuckerstrukturen) quervernetzt, kann eine B-Zell Aktivierung auch T-Zell unabhängig stattfinden.

Für die T-Zell-Hilfe ist eine spezifische Bindung des T-Zell Rezeptors an MHC-II-Peptidkomplexe auf der B-Zell Oberfläche sowie die Bindung von CD40L an CD40 nötig. Aktivierte B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen und können in der Keimzentrumsreaktion die Spezifität des B-Zell Rezeptors steigern und einen Antikörperklassenwechsel durchführen. Plasmazellen sezernieren dann Antikörper, die an körperfremde Epitope auf infizierten Zellen oder auf extrazellulär lokalisierten Erregern binden.

Die Penetration von Zielzellen durch *O. tsutsugamushi* kann *in vitro* durch Antikörper gegen das 56 kDa Oberflächenprotein inhibiert werden [113, 114]. Vakzinierungsstudien im Mausmodell zeigten jedoch, dass Antikörper lediglich einen partiellen Schutz vermitteln können, der zudem nur gegen den homologen *O. tsutsugamushi* Stamm gerichtet ist [5, 115].

1.2.5 Makrophagen

Makrophagen gehören zum angeborenen Immunsystem. Sie entwickeln sich aus Monozyten beim Eintritt in Gewebe. Als Gewebsmakrophagen können sie Pathogene, Zelltrümmer sowie nekrotische und infizierte Zellen phagozytieren. Phagozytierte Pathogene werden in Phagosomen eingeschlossen. Diese fusionieren mit Lysosomen zu Phagolysosomen, in denen verschiedene Effektormechanismen die Pathogene degradieren. Die Inhibition der Phagosomen-Lysosomen-Fusion wie bei *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) [116] oder der Austritt aus den Phagosomen bzw. Phagolysosomen wie bei *L. monocytogenes*, *Rickettsia* spec. oder *O. tsutsugamushi* sind daher zentrale Mechanismen der Immunevasion dieser Erreger. Während Makrophagen zur Phagozytose befähigt sind und auf die intrazelluläre Degradation von Erregern spezialisiert sind, spielen wenigstens einige der Mechanismen, wahrscheinlich in geringerer Intensität, auch in anderen Zelltypen, z.B. Endothelzellen eine Rolle. Die Mechanismen sind bisher jedoch vor allem bei Makrophagen untersucht.

Aktivierung von Makrophagen durch IFN-γ und TNF-α führen zu einer gesteigerten Phagosomen-Lysosomen-Fusion [117] und zu einer Intensivierung von antimikrobiellen Effektormechanismen.

Reaktive Sauerstoffverbindungen

Der Phagozytenoxidase-Komplex wird hauptsächlich in der Phagolysosomenmembran zusammengesetzt [118]. Seine Bedeutung für die Abwehr von Bakterien wird durch die hohe Suszeptibilität gegenüber einer Vielzahl von bakteriellen Erregern bei Menschen mit chronischer Granulomatose deutlich, bei der ein genetischer Defekt im Phagozytenoxidase-Komplex vorliegt. Jones *et al.* zeigten, dass auch Endothelzellen als Antwort auf diverse Stimuli geringe Mengen NADPH-Oxidase exprimieren können [119]. Obwohl reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species, ROS*) hauptsächlich im Phagolysosom produziert werden, konnten Feng *et al.* zeigen, dass *ROS* offenbar auch im Zytosol eine Rolle bei der Degradation von Erregern spielen. Sie zeigten, dass auch das zytosolische Bakterium *R. conorii* in zytokinstimulierten und Katalase-behandelten Endothelzellen, Hepatozyten und Makrophagen besser überlebte als in den ebenso stimulierten Zellen die nicht mit Katalase behandelt wurden [120]. Die Relevanz dieses Mechanismus scheint jedoch erregerabhängig zu sein, da Mäuse mit einem Defekt in der Phagozytenoxidase ($p47^{phox-/-}$) gegenüber ihren Wildtyp-Kontrollen lediglich eine leicht erhöhte Suszeptibilität für den zytoplasmatisch replizierenden Erreger *L. monozytogenes* zeigen [121].

Reaktive Stickstoffverbindungen

Beckerman *et al.* zeigten, dass mit *L. monozytogenes* infizierte Makrophagen, die mit IFN-γ kultiviert werden, große Mengen Stickstoffmonoxid (NO) produzieren und den Erreger töten können. Dieser Effekt kann *in vitro* und *in vivo* durch Applikation von Aminoguanidin, einem Inhibitor der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (*inducible nitric oxide synthase, iNOS*) verhindert werden [122]. MacMicking *et al.* zeigten, dass $iNOS^{-/-}$ Mäuse eine höhere Suszeptibilität für *L. monozytogenes* haben, als Wildtyp Mäuse [123]. Auch *R. conorii* kann effektiv durch reaktive Stickstoffverbindungen (*reactive nitrogen intermediates*, *RNI*) bekämpft werden [120]. Die bakterizide Wirkung von NO sowie der weiteren, daraus entstehenden *RNI*, ist nicht zwingend auf eine direkte Schädigung lebenswichtiger Moleküle der Erreger zurückzuführen. So konnten Herbst *et al.* zeigen, dass *M. tuberculosis* infizierte Makrophagen die Bakterien indirekt durch NO vermittelte Apoptose der Makrophagen töten [124]. *R. conorii* wird in Makrophagen und Endothelzellen wirksam durch *iNOS*-abhängige Mechanismen bekämpft [120, 125]. Neben der bakteriziden Funktion können *RNI*, insbesondere zusammen mit *ROI*,

auch mit Proteinen und DNA von eukaryotischen Zellen reagieren und Gewebeschäden verursachen [126]. NO wirkt außerdem vasodilatativ und kann an der Entstehung von Schockzuständen beteiligt sein [123]. Auf diese Weise kann NO indirekt zu schweren Lungenpathologien beitragen [127].

Tryptophan-Deprivation

Ein weiterer Effektormechanismus von Makrophagen und vielen anderen Zellen ist die Expression des Enzyms Indolamindioxygenase (*indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO*), welches zu einer Deprivation der Aminosäure Tryptophan führt. Das intrazelluläre replizierende Protozoon *Toxoplasma gondii* und das obligat intrazellulär replizierende Bakterium *Chlamydia* spec. liegen nicht frei im Zytoplasma, sondern in einer membranumschlossenen Vakuole vor. Nach Aktivierung der Makrophagen durch IFN-γ oder IFN-β können die Erreger erfolgreich durch *IDO* bekämpft werden. [128-132]. Tryptophan-Limitation hemmt auch das Wachstum von *R. conorii* in der humanen Makrophagen Zelllinie THP-1 [120]. *IDO* interagiert in vielfältiger Weise mit dem Immunsystem. Die Funktionen von *IDO* wurden 2008 von Zelante *et al.* zusammenfassend diskutiert (*Review*: [133]).

Autophagie

Die klassische Rolle von Autophagie ist der intrazelluläre Abbau von beschädigten Organellen wie z.B. Mitochondrien. Innerhalb der letzten Jahre wurde zudem klar, dass Autophagie eine Rolle für die Abwehr zytoplasmatischer Erreger spielt. Rich *et al.* zeigten, dass *L. monocytogenes* unter Chloramphenicol-Behandlung autophagozytiert wird [134]. Später wurde gezeigt, dass auch Mykobakterien sowie fakultativ zytoplasmatisch lebende Streptokokken und Shigellen über Autophagozytose abgebaut werden können [135-137].

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die Erforschung der Immunreaktion gegen *O. tsutsugamushi* kann entscheidend zum Verständnis der Immunreaktion gegen intrazelluläre Erreger beitragen. Der Erreger verfügt über sehr spezielle mikrobiologische Eigenschaften, wie das Fehlen von LPS und Peptidoglycan [12] in der bakteriellen Zellwand, sowie eine für Bakterien außergewöhnliche Zell-zu-Zell Ausbreitung durch einen *budding*-Prozess [1]. Für die Abwehr dieses Erregers könnten daher immunologische Mechanismen zum Tragen kommen, die in anderen Modellen verdeckt bleiben. Desweiteren wurde bereits in humanen Studien und im Mausmodell gezeigt, dass *O. tsutsugamushi* nach der Akutphase der Infektion in eine Latenzphase übergeht, in der das

Bakterium mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachweisbar ist. Dennoch kann die Infektion nach einer Schwächung des Immunsystems wieder aufflammen. Solche Latenzphasen sind auch von anderen Erregern bekannt, allerdings immunologisch nur unzureichend verstanden (*Reviews*: [138, 139]).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein nichtletales Infektionsmodell von *O. tsutsugamushi* Karp in der Maus etabliert werden. Die Bakterienlast im Blut und in potentiellen Zielorganen sollte im zeitlichen Verlauf der Infektion durch die Quantifizierung von erregerspezifischer DNA mittels Real-Time-PCR (qPCR) gemessen werden. Die Relevanz des Modells für die natürliche Infektion des Menschen sollte anhand von histologischen Veränderungen im Zielgewebe gezeigt werden.

Die Immunreaktion gegen *O. tsutsugamushi* sollte in den sekundären lymphatischen Organen und in einem Zielgewebe der Infektion untersucht werden. Der Schwerpunkt sollte dabei auf die lymphozytäre Antwort während der Akutphase einer primären Infektion gelegt werden. Dazu sollte die Art und Menge der beteiligten Lymphozyten sowie ihr Zytokinprofil bestimmt werden, um Hinweise auf beteiligte Effektormechanismen zu erhalten. Um die Bedeutung vermuteter Effektormechanismen zu zeigen, sollten Infektionen in Mäusen durchgeführt werden denen diese Mechanismen fehlten.

Kapitel 2: Material

2.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Blotting-Apparatur	Peqlab, Erlangen
CO_2-Inkubatoren	Binder, Tuttlingen Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Aria III	
LSR-II	
Accuri-C6	
Elektrophoresekammern / Gelapparaturen	
SDS-PAGE	Peqlab, Erlangen
Agarose-Gele	Peqlab, Erlangen
Flüssigstickstoffbehälter	Air Liquide, Marne la Vallee, Frankreich
Fotoscanner	Visioneer, Pleasanton, USA
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator (Precellys 24)	Peqlab, Erlangen
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz Bosch, Gerlingen
Lightcycler 480 II	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz,
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikroskope	
Lichtmikroskope, invers	Hund, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop, Axioskop 2 plus	Zeiss, Jena
Fluoreszenz-Mikroskop, Keyence	Keyence, Neu-Isenburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer (Nanodrop 2000c)	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipettierhilfen	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt Integra Biosciences, Fernwald

Gerät	Hersteller
Plattenphotometer (MRX II)	Dynex Technologies, Berlin
Sicherheits- und Sterilwerkbänke	BDK Luft und Reinraumtechnik, Sonnenbühl
Spannungsquelle (für SDS-PAGE und Westernblot)	Peqlab, Erlangen
Thermocycler	Peqlab, Erlangen
UV-Transilluminator	International Biotechnologies, USA
Vortexer	Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich VWR, Darmstadt
Waagen Analysenwaage Digitalwaage	Sartorius AG, Göttigen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellerntegerät, Microcell Harvester	Inotech, Reppischhof, Schweiz
Zentrifugen	
Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau
Megafuge 1.0 und 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge 3-16 K	Sigma, Osterode am Harz
β-Szintillationszähler (1450 Microbeta)	PerkinElmer/Wallace, Freiburg
γ-Bestrahlungsgerät	STS, Braunschweig

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Chirurgische Einmal-Skalpelle, steril	Braun, Melsungen
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
ELISA-Platten (Microlon, 96 Well, Flachboden)	Greiner, Frickenhausen
FACS-Röhrchen (5 ml Polystyren)	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen, Biosphere, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Glasfaserfilter	Wallac, Turku, Finnland
Glaskapillaren, steril	Brandt, Wertheim
Kanülen (18, 20, 27 Gauge), steril	Braun, Melsungen
Knopfkanülen (1428 a'LL)	Acufirm, Ernst Kratz, Dreieich
Kryoröhrchen, steril	Sarstedt, Nümbrecht

Material	Hersteller
Maskierte Objektträger, 12-Well	Thermo Scientific, Braunschweig
Neubauer Zählkammern	Hecht-Assistent, Sondheim
Nitrocellulose-Membranen	Pall Life Sciences, Dreieich
Objektträger (Mattrand)	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Pasteurpipetten (3,4 ml)	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsplatten (96-Well, 384-Well)	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
Petrischalen, 92 mm, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml), steril	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Precellys-Röhrchen (1,4/2,8 mm)	Peqlab, Erlangen
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Schottflaschen	Schott, Mainz
Spritzen (1 ml, 5 ml), steril	Braun, Melsungen
Sterilfilter (0,22 µm und 0,45 µm), steril	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfiltergefäße (Stericup), steril	Millipore, Bedford, USA
Zellkulturflaschen (25 cm^2, 75 cm^2, 175 cm^2), steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten, steril 96-Well, Rundboden 24-Well, Flachboden 6-Well, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsiebe (Cell Strainer, 100 µm), steril	BD Falcon, Heidelberg
Zellsiebe (CellTrics, 30 µm)	Partec, Görlitz
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml), steril	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Standardchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

2.3.1 Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

Reagens	Hersteller
1-Methyl-D-Tryptophan (1-MT)	Sigma, Deisenhofen
^{3}H-Thymidin (1 mCi/ml)	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Bodipy-TR Ceramid	Invitrogen, Eugene, USA
Collagenase D	Roche Diagnsotics, Risch, Schweiz
Cytofix/Cytoperm- und Perm/Wash-Lösung	Becton Dickinson, Heidelberg
DAPI	Sigma, Deisenhofen
DNAse I	Sigma, Deisenhofen
$F_c$block	BNI, Hamburg
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin	Sigma, Deisenhofen
GolgiStop	BD Pharmingen, Heidelberg
HEPES	PAA, Linz, Österreich
IFN-γ (Maus, rekombinant)	Millipore, Billerica, USA
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen
Ketamin (Ketavet)	Pharmacia, Berlin
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
N-Monomethyl-L-Arginin (NMMA)	Sigma, Deisenhofen
$OVA_{257-264}$ (SIINFEKL)	JPT Peptide Technologies, Berlin
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640 Kulturmedium ohne L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe
Tetramethylbenzidin (TMB) für *Immunofocus*-Assay	Mikrogen, Neuried
Tetrazyklin	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Wortmannin	Sigma, Deisenhofen
Xylazin (Rompun)	Bayer, Leverkusen

2.3.2 Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Reagens	Hersteller
10× Puffer für DNA Polymerase HotStarTaq	Qiagen, Hilden
Agarose	Roth, Karlsruhe
Alkaline Phosphatase (*Shrimp*)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ampullenwasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roche Diagnsotics, Risch, Schweiz
Desoxyribonukleosidtriphosphate (GeneAmp dNTP-Mix)	Applied Biosciences, Carlsbad, USA
DMEM	Gibco, Eggenstein
DNA Polymerase HotStarTaq	Qiagen, Hilden
DNA Polymerase Platinum Taq	Invitrogen, Darmstadt
DNA-Ladepuffer (6x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Molekulargewichtsmarker GeneRuler 100 bp plus GeneRuler 1 kbp DNA ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GelRed	Biotium, Hayward, USA
HBS (Hepes buffered saline) (2×)	Fluka, Buchs, Schweiz
Luria Bertani (LB) Agar	Sigma, Deisenhofen
Luria Bertani (LB) Medium	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/ Streptomycin	Gibco/BRL GmbH, Eggenstein
Polybren	Sigma, Deisenhofen
Puffer R	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonuklease HindIII	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SYBR Green I	Invitrogen, Darmstadt
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Darmstadt

2.3.3 Reagenzien für proteinchemische Arbeiten

Reagens	Hersteller
Acrylamid / Bisacrylamid (29:1) 30%	Roth, Karlsruhe
Chemilumineszenz-Substrat	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Coomassie Brillant Blue	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, Deisenhofen
ELISA Kits (DuoSet)	R&D Systems, Wiesbaden
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Modified Lowry protein assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Proteingrößenmarker Standard Prestained	Roth, Karlsruhe
Tetramethylbenzidin (TMB) für ELISA	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Serva, Heidelberg
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg

2.3.4 Antikörper

Tabelle 2.3.1: Antikörper für die FACS-Analyse.

Antikörper	Klon	Verdünnung	Hersteller
anti-CD11b-PerCP-Cy5.5	M1/70	1:100	BD, Heidelberg
anti-CD11c-PE	HL3	1:100	BD, Heidelberg
anti-CD3e-PE	145-2C11	1:50	BD, Heidelberg
anti-CD45R(B220)-APC	RA3-6B2	1:300	BD, Heidelberg
anti-CD49b(DX5)-PE	DX5	1:100	BD, Heidelberg
anti-CD4-FITC	RM4-5	1:400	BD, Heidelberg
anti-CD4-V500	RM4-5	1:200	BD, Heidelberg
anti-CD62L-FITC	MEL-14	1:300	BD, Heidelberg
anti-CD8a-eFluor450	53-6.7	1:100	ebioscience, Frankfurt
anti-CD8a-PerCP-Cy5.5	53-6.7	1:100	BD, Heidelberg
anti-Gr1-FITC	RB6-8C5	1:200	BD, Heidelberg
anti-IFN-γ-FITC	XMG1.2	1:100	BD, Heidelberg
anti-TNF-α-APC	MP6-XT22	1:100	BD, Heidelberg

Antikörper	Klon	Verdünnung	Hersteller
Ratte IgG1κ-APC (Isotypkontrolle)	R3-34	1:100	BD, Heidelberg
Ratte IgG1κ-FITC (Isotypkontrolle)	R3-34	1:100	BD, Heidelberg

Antikörper für ELISA

Alle ELISAs (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN-γ, TNF-α) wurden mit den ELISA Kits (DuoSet) der Firma R&D Systems, Wiesbaden, durchgeführt.

Tabelle 2.3.2: Antikörper für Immunfluoreszenz und Westernblot

Antikörper	Klon	Hersteller
Maus-anti-56 kDa (*O. tsutsugamushi*)	2f2	BNI, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG (H+L) DyLight 488	polyklonal	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Peroxidase	polyklonal	Dianova, Hamburg

Tabelle 2.3.3: Antikörper für Depletion, Neutralisierung und Restimulation

Antikörper	Klon	Hersteller
anti-CD3	145-2C11	BNI, Hamburg
anti-CD8	YTS169	BNI, Hamburg
anti-IFN-γ	XMG1.2	BNI, Hamburg
Ratten IgG (Extrakt)		Sigma, Deisenhofen

2.4 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Stammlösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit doppelt destilliertem Wasser (*Aq. bidest.*) angesetzt. Der pH-Wert der Puffer wurde ggf. auf den angegebenen Wert mit HCl_{aq} bzw. $NaOH_{aq}$ eingestellt. Steril benötigte Lösungen wurden autoklaviert, steril filtriert (Porengröße 0,22 µm) oder aus sterilen Reagenzien hergestellt. FCS wurde zur Inaktivierung 30 min bei 56 °C inkubiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.1 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen für zellbiologische und tierexperimentelle Arbeiten

Medium/Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung	pH
Collagenase / DNAse-Lösung	1:100 Collagenase-Stammlösung 10 µg/ml DNAse I in $R5F^{-G}$	
Collagenase-Lösung	1:100 Collagenase-Stammlösung in $R5F^{-G}$	
Collagenase-Stammlösung	20mg/ml Collagenase D bei -20 °C gelagert	
Erythrozytenlysepuffer	10 % 0,17 M TRIS pH 7,4 90 % 0,17 M NH_4Cl	
FACS-Puffer	1 % FCS 0,01 % NaN_3 in PBS	
Formalinlösung	4 % Formalin	
Ketamin/Xylazin-Lösung	12 mg/ml Ketamin 1,6 mg/ml Xylazin in PBS	
Kryomedium	60 % FCS 40 % DMSO	
Methylcellulose-Lösung	16,8 g Methylcellulose in 600 ml Wasser autoklaviert und bei 4 °C gelagert	
Methylcellulose-Medium	33 % Methylcellulose-Lösung 67 % $R10F^{-G}$	
Paraformaldehyd-Lösung 1 % (IIF)	1 % Paraformaldehyd	7,4
Paraformaldehyd-Lösung 4 % (FACS)	4 % Paraformaldehyd	7,4
PBS (10x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 100 mM Na_2HPO_4 2 mM KH_2PO_4	7,4
RPMI-Medien: $R5F^{+G}$ / $R5F^{-G}$ / $R10F^{-G}$/ $R10F^{+G}$	500 ml RPMI 1640-Medium ohne Glutamin 50 ml FCS (100 ml für $R10F^{-G}$-Medium) 10 ml HEPES (1 M) 10 ml L-Glutamin (200 mM) 2,5 ml Gentamycin (10 mg/ml) (für $R5F^{-G}$) 500 µl β-Mercaptoethanol	
Trypanblau-Lösung	2 % Trypanblau (50x) in PBS	

2.4.2 Puffer und Stammlösungen für molekularbiologische Arbeiten

Medium/Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung	pH
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml	
DMEM–Vollmedium (high Glucose)	10 % FCS 1 mM Natriumpyruvat 20 mM HEPES 1 % Penicillin / Streptomycin	
Sybr Green Lösung	1:1000 Sybr Green I in DMSO	
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris-Base 57,1 ml Essigsäure (100 %) 100 ml EDTA (0,5 M)	

2.4.3 Puffer und Stammlösungen für proteinchemische Arbeiten

Medium/Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung	pH
Blockpuffer	400 ml TBS-T 20 g Milchpulver	
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol 10 % Essigsäure	
Coomassie-Lösung	40 % Methanol 10 % Essigäure 0,25 % (w/v) Commassie Brilliant Blue	
ELISA-Stopplösung	2 M H_2SO_4	
ELISA-Substratlösung	12 ml ELISA-Substratpuffer 200 µl ELISA-TMB-Lösung 1,2 µl 30 % H_2O_2	
ELISA-Substratpuffer	100 mM NaH_2PO_4	
ELISA-TMB-Lösung	30 mg Tetramethylbenzidin (TMB) in 5 ml DMSO	
ELISA-Waschpuffer	1x PBS mit 0,05 % (w/v) Tween 20	

Lämmli-Puffer (5x)	0,6 ml Tris/HCl (0,5 mM, pH 6,8) 2 ml SDS (10 %) 5 ml Glycerol (50 %) 1 ml Bromphenolblau (1 %) 0,9 ml *Aq. bidest.* 500 µl β-Mercaptoethanol	
PBS-Tween	0,1 % Tween 20 in PBS	
Sammelgel	3 ml *Aq. bidest.* 1,25 ml Tris/HCl (O,5 M, pH 6,8) 50 µl SDS (10 %) 650 µl Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) 25 µl Ammoniumpersulfat (10 %) 5 µl TEMED	
SDS-Laufpuffer (10x)	30 g Tris-Base 144 g Glycin 10 g SDS *ad* 1 l *Aq. bidest*	
TBS (10x)	24,2 g Tris-Base 80 g NaCl *ad* 1 l *Aq. bidest.*	7,6
TBS-Tween	10 % TBS (10x) 0,1 % Tween 20	
Transferpuffer	3,025 g Tris-Base 15 g Glycin 200 ml Methanol *ad* 1 l *Aq. bidest.*	8,5
Trenngel (12 %ig)	4,14 ml *Aq. bidest.* 3 ml Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8) 120 µl SDS (10 %) 4,8 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) 60 µl Ammoniumpersulfat (10 %) 6 µl TEMED	

2.5 Nukleinsäuren

Tabelle 2.5.1: Oligonukleotide.
Alle Oligonukleotide wurden von der Firma TIB Molbiol, Berlin bezogen.

Bezeichnung	Sequenz
traD-fw (3b)[1]	CACAACATCCAAATGTTCAG
traD-rv (6a)[1]	GCACCATTCTTGACGAAA
traD-fw (1b)[1]	ATGGATGAGGTTAACCT
traD-rv (4c)[1]	GCTTTATTTTGCTGTTCYTTATC
traD-fw (4c)[1]	GATAAUGAACAGCAAAATAAAGC
traD-rv (5a)[1]	TTCCATTTTAAGCCATGAAGGCGAATGT
TSUS1	ACGTAAGCGGTTTAAACTTAC
TSUAS2	AATATCAATCCCAAAGTCACGAT

Tabelle 2.5.2: Plasmide

Bezeichnung	Hersteller
iC2-47kDa lentiviraler Vektor zur Expression des 47 kDa-Antigens (Aminosäuren 42-435) von *O. tsutsugamushi* Karp als Fusionsprotein mit den Ovalbumin-Epitopen $Ova_{257-264}$ und $Ova_{323-339}$	Osterloh, Papp, BNI
iC2-56kDa lentiviraler Vektor zur Expression des 56 kDa-Antigens (Aminosäuren 80-456) von *O. tsutsugamushi* Karp als Fusionsprotein mit den Ovalbumin-Epitopen $Ova_{257-264}$ und $Ova_{323-339}$	Osterloh, Papp, BNI
Gag/Pol (pMDLg/pRRE)	Dull *et al.* [140]
Rev (pRSV-Rev)	Dull *et al.* [140]
Env (phCMV-VSV-G)	Stewart *et al.* [141]
LeGO-C2	Weber et al. [142]

[1] Für die Entwicklung der traD-PCR wurden die *primer*-Kombinationen fw1b/rv4c, fw1b/rv5a, fw3b/rv4c, fw3b/rv6a, fw4c/rv5a und fw4c/rv6a getestet. In der Routine wurde die Kombination fw3b/rv6a eingesetzt.

2.6 Zelllinien, Bakterien und Tiere

Tabelle 2.6.1: Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
232-Makrophagen	Prof. Dr. DT Golenbock, University of Massachusetts Medical School, USA
HEK293t	Kristoffer Weber, Hamburg
L929-Mausfibroblasten	DSMZ, Braunschweig

Tabelle 2.6.2: Bakterien

Bakterienstamm	Herkunft
Orientia tsutsugamushi Karp	Dr. J. Stenos, Divison of Veterinary and Biomedical Science, Murdoch University, Murdoch, Australien

Tabelle 2.6.3: Mausstämme

Mausstamm	Züchter
BALB/c	Charles River, Sulzfeld
C57Bl/6 und C57Bl/6 $\beta_2m^{-/-}$ [143]	Universität Freiburg
C57Bl/6N	Charles River, Sulzfeld
OT-I [144]	BNI, Hamburg

2.7 Software

Software	Hersteller
BioEdit 7.0.5.3	Abbott Laboratories, Carlsbad, USA
JalView 2.6.1 [145]	Universität Dundee, UK
FlowJo 7.6.5 und 9.5.2	Treestar, Ashland, USA
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software, La Jolla, USA
Gimp 2.6	Open source
CFlow 1.0.227.1	Becton Dickinson, Heidelberg
PriProbit [146]	Dr. M. Sakuma, Universität Kyoto, Japan

Kapitel 3: Methoden

3.1 Zellbiologische Arbeiten

Alle Zentrifugationsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, 5 min bei 1200 rpm bei Raumtemperatur durchgeführt. Inkubationen fanden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur statt.

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Für Zellkulturen und Restimulationen aus *ex vivo* isolierten Zellen wurden sterile Materialien und Arbeitsmethoden angewendet. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 in gesättigter Wasserdampfatmosphäre kultiviert.

Nicht infizierte L929- und Vero-Zellen wurden in $R5F^{+G}$, nicht infizierte 232-Makrophagen in $R10F^{+G}$ kultiviert und zweimal pro Woche geteilt.

O. tsutsugamushi-infizierte L929 Zellen wurden von den Technischen Assistenten der Arbeitsgruppe fortlaufend in Kultur gehalten. Dazu wurden am Vortag der Infektion L929-Zellen mit 3000 rad γ-bestrahlt und in $R5F^{-G}$ kultiviert. Für die Infektion wurden zwei bis drei Wochen alte infizierte L929-Zellen mit einem Zellspachtel abgelöst und ein Teil der Zellsuspension auf neue, konfluente L929-Zell-*Monolayer* pipettiert. Die Zellen wurden 30 min bei 800 rpm zentrifugiert oder 1 h ohne Zentrifugation stehen gelassen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in $R5F^{-G}$ kultiviert. Das Medium wurde nach drei Tagen einmal gewechselt, danach wurde es nicht mehr gewechselt.

3.1.2 Herstellung von infektiösen- und L929-Kontrollinokulaten

Infektiöse Inokulate bzw. L929-Kontrollinokulate wurden chargenweise aus infizierten L929-Zellen der laufenden Kultur bzw. aus nicht infizierten L929-Zellen hergestellt. Die Zellen aus vier 75 cm^2-Zellkulturflaschen wurden vereint, zentrifugiert und die Zellpellets in 28 ml

RPMI-Vollmedium resuspendiert. Je 0,5 ml der Zellsuspension wurden in Kryoröhrchen aliquotiert, mit 0,5 ml Kryomedium pro Röhrchen vermischt und schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.1.3 Immunfluoreszenz

Ca. 2×10^6 Zellen aus einer fortlaufenden *O. tsutsugamushi* infizierten- oder nicht infizierten Kultur wurden mit Zellschabern aus ihren Kulturflaschen abgelöst, anschließend in FACS-Röhrchen übergeführt und pelletiert. Die Zellen wurden 1 h mit 100 µl anti-56 kDa mAk (1:10.000 in PBS) inkubiert, anschließend gewaschen und danach 1 h mit 100 µl PBS + 1:100 anti-Maus-IgG-DyLight488 + 1:2000 DAPI inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder gewaschen und dann 30 min mit 50 µl einer 5 µg/ml BODIPY-Ceramid-Lösung inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen 30 min in 100 µl 4 % PFA fixiert. Nach einem letzten Waschschritt wurden die Zellen in verschiedenen Zellkonzentrationen auf maskierte Objektträger getropft und zum Trocknen stehen gelassen. Danach wurden sie mit Eindeckmedium und Deckgläschen eingedeckelt und über Nacht im Dunklen zum Trocknen gelegt. Die Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop bei 100× Objektivvergrößerung gesichtet.

3.1.4 Quantifizierung von infektiösen Inokulaten – *Immunofocus*-Assay

Die Infektiosität der Inokulate wurde *in vitro* durch den *Immunofocus*-Assay bestimmt. Dazu wurden L929-Zellen mit 3000 rad γ-bestrahlt und je 4×10^5 Zellen in 1 ml R10F pro Well in 24 Well Platten ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein Kryoröhrchen des Inokulats zügig in der Hand aufgetaut, mit $R5F^{-G}$ gewaschen und $^1/_2$ der Suspension auf 10 ml mit $R5F^{-G}$ aufgefüllt. Davon ausgehend wurden vier serielle 1:4 Verdünnungen in $R5F^{-G}$ hergestellt. Das Medium wurde von den Platten abgenommen und 200 µl $R5F^{-G}$ sowie 200 µl der Inokulatverdünnungen bzw. $R5F^{-G}$ auf die Wells pipettiert. Von jeder Verdünnung wurden Quadruplikate angesetzt. Die Platte wurde 30 min bei 800 rpm zentrifugiert um eine effektive Infektion zu gewährleisten. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Wells zweimal mit $R5F^{-G}$ gewaschen und 14 Tage in Methylcellulose-Medium kultiviert. Danach wurde das Medium abgenommen, die Platten einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 bis 24 h in 4 % Formalin fixiert. Dann wurden infizierte Stellen im Zellrasen (*Spots)* gefärbt. Dazu wurden die Platten wie folgt mit verschiedenen Reagenzien inkubiert, wobei vor jedem Schritt mindestens einmal mit PBS gewaschen wurde. Zuerst wurden die Zellen 30 min mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert, anschließend 1 h in Block-

puffer, danach 1 h mit anti-56kDa mAk (1:2000) und dann 1 h mit POD-konjugiertem anti-Maus mAk (1:2000 in PBS) inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und in TMB-Substrat inkubiert, bis blaue *Spots* klar erkennbar waren. Die Reaktion wurde letztlich durch zweimaliges Waschen in *Aq. bidest* abgestoppt. Die *Spots* wurden gezählt und gegen die Inokulatverdünung aufgetragen. Es wurden Regressionskurven nach einphasiger logarithmischer Assoziation bestimmt. Der Anteil eines Inokulats, bei welchem 50 infektiöse *Spots* pro *Well* entstehen, enthält die Infektiositäts-Einheit 50 *spot-forming-units* (*sfu*).

3.1.5 Aufreinigung von *O. tsutsugamushi* aus Zellkulturen

Zunächst wurden Vero- bzw. L929-Zellen, welche zwei bis drei Wochen zuvor mit *O. tsutsugamushi* infiziert wurden, im Kulturmedium mit einem Zellschaber abgelöst und 30 min bei 4000 rpm pelletiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in jeweils 11 ml $R5F^{-G}$ resuspendiert und in 15 ml Zentrifugenröhrchen übergeführt. Die Suspensionen wurden mit Glasschrott versetzt und 5 min bei 1400 rpm bei Raumtemperatur auf einem Thermomixer geschüttelt. Die Suspensionen wurden ohne Glasschrott in neue 15 ml Zentrifugenröhrchen übergeführt. Für die Herstellung von Antigen für die Restimulation sowie für die Durchführung einer SDS-PAGE wurden die Suspensionen 1 h bei 25 kHz und 100 % Leistung im Ultraschallbad behandelt, dabei wurde durch Zugabe von Eis sichergestellt, dass die Temperatur im Bad 37 °C nicht überstieg. Die Ultraschallbehandlung wurde nicht für die Herstellung von Inokulaten für *in vitro* Infektionen durchgeführt. Die Suspensionen wurden resuspendiert und 1 h bei 1200 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue 15 ml Zentrifugenröhrchen übergeführt und die Bakterien ggf. bei 4000 rpm über 30 min pelletiert, in PBS gewaschen und im benötigten Volumen resuspendiert. Für die Verwendung als Antigen für die *in vitro* Restimulation und für die SDS-PAGE wurde die Suspension zuletzt 30 min bei 56 °C inaktiviert.

3.1.6 Herstellung und Quantifizierung von *O. tsutsugamushi* Antigen

Antigen wurde entsprechend Kapitel 3.1.3 aus zehn 75 cm^2 Zellkulturflaschen mit *O. tsutsugamushi* infizierten L929-Zellen hergestellt und zuletzt in 3 ml PBS resuspendiert. Die Proteinkonzentration des Antigens wurde mit dem „modified Lowry protein assay Kit“ in einer 96 Well Platte in Triplikaten nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Standardreihe aus definierten Konzentrationen BSA wurde mitgeführt. Die Messung erfolgte mit dem NanoDrop Photometer bei 750 nm. Die Auswertung erfolgte anhand der BSA-Standardkurve.

3.1.7 Präparation von Zellsuspensionen aus Mausorganen

Milz und Lymphknoten

Die Organe wurden in 4 ml $R5F^{-G}$ zwischen zwei Objektträgern (Mattrand) zerrieben und die Zellen anschließend pelletiert. Zellen aus Lymphknoten wurden gezählt und direkt verwendet. Splenozyten wurden zunächst mit 5 ml Erythrozytenlysepuffer versetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend dreimal in $R5F^{-G}$ gewaschen und die Zellzahl bestimmt.

Lunge

Lungen wurden zunächst mit einem Skalpell sehr fein zerschnitten und die Gewebestückchen in 3 ml Collagenase/DNAse-Lösung (für Restimulationen und FACS-Analysen) bzw. in Collagenase-Lösung (für Zellsortierung und anschließende Bestimmung der Erregerlast mittels qPCR) aufgenommen und in 15 ml Zentrifugenröhrchen übergeführt. Die Suspension wurde 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, wobei die Gewebestückchen alle 15 min mit einer Pasteurpipette geschert wurden. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 mM EDTA und fünfminütige Inkubation abgestoppt. Die Suspensionen wurden durch 100 µm Zellsiebe (Cell Strainer) gegeben, die Zellen anschließend pelletiert und die Zellzahl bestimmt.

3.1.8 Zellzahlbestimmung

10-50 µl der Zellsuspension wurden je nach Zelldichte in einem geeigneten Verhältnis in Trypanblau verdünnt und die vitalen (farblosen) Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellkonzentration wurde durch Multiplikation mit dem Kammerfaktor (10^4) und dem Verdünnungsfaktor errechnet.

3.1.9 Durchflusszytometrie

Färbung von Lungenzellen für die Sortierung am FACS-ARIA

Zellen aus drei Mauslungen wurden in einem 50 ml Reaktionsgefäß vereint und pelletiert. Die Zellpellets wurden unter Vortexen mit 5 ml -20 °C kalten Methanols versetzt und mindestens über Nacht bei -20 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend erst 10 min bei 4 °C mit 500 µl $F_c$block, dann 1 h bei 4 °C mit zusätzlich 500 µl $F_c$block mit den benötigten Antikörpern in den im Kapitel Material angegebenen Verdünnungen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal in FACS-Puffer gewaschen und dann in FACS-Puffer resuspendiert und über Zellsiebe (CellTrics) gefiltert. Die benötig-

ten Zellpopulationen wurden am FACS-ARIA bei 4 °C in PBS sortiert. Anschließend wurde eine Reanalyse der sortierten Populationen ebenfalls am FACS-ARIA vorgenommen.

Färbung von Zellen für die Messung am accuri-C6 oder LSR-II Durchflusszytometer

Je 1×10^6 Zellen wurden in die Wells einer 96 Well Rundbodenplatte vorgelegt. Die Platte wurde zentrifugiert und anschließend 25 µl $F_c$block zu den Zellen pipettiert und 10 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden 25 µl $F_c$block mit den für die Oberflächenfärbung benötigten Antikörpern in den im Kapitel Material angegebenen Verdünnungen hinzugefügt und 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Wenn eine intrazelluläre Färbung nötig war, wurden die Zellen nun 30 min bei 4 °C mit 100 µl Cytofix/Cytoperm inkubiert, anschließend zweimal mit Perm/Wash-Puffer gewaschen, eine Stunde bei 4 °C in Perm/Wash-Pufffer mit den für die intrazelluläre Färbung benötigten Antikörpern in den im Kapitel Material angegebenen Verdünnungen inkubiert, zweimal in Perm/Wash-Puffer gewaschen und schließlich in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Wenn keine intrazelluläre Färbung nötig war, wurden die Zellen für mindestens 30 min in 1 % PFA inkubiert. Die Messung erfolgte entweder am accuri-C6 oder am LSR II Durchflusszytometer.

Für die Messung am accuri-C6 Durchflusszytometer wurden teilweise Oberflächenfärbungen in FACS-Röhrchen durchgeführt. Dazu wurden die für die Färbung in 96 Well Platten angegebenen Volumina verdoppelt.

3.1.10 *in vitro* Restimulation

Stimulation mit PMA/Ionomycin für die durchflusszytometrische Messung intrazellulärer Zytokine

Je 1×10^6 Zellen in 200 µl $R5F^{+G}$ wurden mit 1:400 Golgi-Stop sowie 1:100.000 der PMA-Stammlösung und 1:4000 der Ionomycin-Stammlösung in den Wells einer 96 Well Rundbodenplatte 4 h bei 37 °C kultiviert.

Stimulation mit anti-CD3 mAk oder *O. tsutsugamushi* Antigen für die Messung der Lymphozytenproliferation und für die Messung von Zytokinen in den Überständen

Je 2×10^5 Zellen in 200 µl $R5F^{+G}$ wurden mit 2 µg/ml anti-CD3 mAk oder 15 µg/ml *O. tsutsugamushi* Antigen oder ohne Stimulanz in Wells einer 96 Well Rundbodenplatte drei Tage bei 37 °C kultiviert. Jede Probe wurde mindestens in Triplikaten (mindestens Duplikate bei Lymphknoten aus nicht infizierten Tieren) stimuliert. Anschließend wurden jeweils 120 µl des Überstands pro Well abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Die Zellen mit dem restli-

chen Medium wurden entsprechend dem Abschnitt „Messung der Lymphozytenproliferation“ weiterverarbeitet.

Stimulation mit antigenpräsentierenden Zellen oder mit anti-CD3 mAk für die durchflusszytometrische Messung intrazellulärer Zytokine

Je 1×10^6 Splenozyten in 200 µl $R5F^{+G}$ wurden mit 2×10^5 antigenpräsentierenden Zellen oder 2 µg/ml anti-CD3 mAk oder ohne Stimulans in Wells einer 96 Well Rundbodenplatte 8 h bei 37 °C kultiviert bzw. cokultiviert, wobei nach der ersten Stunde 1:400 Golgi-Stop hinzugefügt wurde.

Stimulation mit antigenpräsentierenden Zellen oder mit anti-CD3 mAk für die Messung von Zytokinen in den Überständen

Je 2×10^5 Splenozyten in 200 µl $R5F^{+G}$ wurden mit 2×10^5 antigenpräsentierenden Zellen oder 2 µg/ml anti-CD3 mAk oder ohne Stimulans in Wells einer 96 Well Rundbodenplatte vier Tage bei 37 °C kultiviert bzw. cokultiviert. Anschließend wurden 120 µl des Überstand abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

3.1.11 Transduktion von 232-Makrophagen mit lentiviralen Partikeln

Die Transduktion von Zellen erfolgte modifiziert nach Weber *et al.* [142]. Je 5×10^4 232-Makrophagen in 0,5 ml $R10F^{+G}$ wurden in Wells einer 24 Well Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden 8 µg/ml Polybren und 10 µl (C2) bzw. 100 µl (iC2-47kDa und iC2-56kDa) der lentiviralen Partikel hinzugefügt (die optimale Menge der Partikel wurde zuvor austitriert). Die Platte wurde 1 h bei 1000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen $R10F^{+G}$ ausgetauscht. Die Zellen wurden in $R10F^{+G}$ kultiviert und mindestens einmal pro Woche geteilt. Zu Versuchsbeginn zeigten die Zellen mindestens eine schwache Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop.

3.1.12 Infektion, Stimulation und Inhibition antibakterieller Effektormechanismen von 232-Makrophagen

Je 2×10^5 232-Makrophagen in $R5F^{-G}$ wurden in die Wells von 24 Well Platten pipettiert und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium abgenommen, anschließend je Well 500 µl einer aufgereinigten *O. tsutsugamushi* Suspension (Material aus einer 75 cm^2 Zellkulturflasche für eine 24 Well Platte) auf die Zellen pipettiert und 30 min bei 800 rpm zentrifu-

giert, um eine effektive Infektion zu gewährleisten. Danach wurden die Wells zweimal mit $R5F^{-G}$ gewaschen und je Well 1 ml $R5F^{-G}$ mit 10 µg/ml Tetrazyklin, mit 10, 100 oder 1000 U IFN-γ, mit 100 U IFN-γ sowie 1 mM Methyltryptophan oder ohne Stimulans auf die Zellen pipettiert. Entsprechend den Angaben in der Abbildungslegende wurden 1 µg/ml anti-IFN-γ mAk, 1 mM N-Monomethylarginin oder 0,1 µM Wortmannin zu den Kulturen hinzugefügt. Alle Bedingungen wurden in Quadruplikaten angesetzt.

Um die Erregerlast in den 232-Makrophagen zu bestimmen wurden die Kulturüberstände abgenommen, 1 ml PBS zu den Zellen gegeben und die Zellen mit der Pipette resuspendiert. 200 µl der Zellsuspension wurden für eine DNA-Extraktion entnommen.

3.2 Molekularbiologische Arbeiten

Für molekularbiologische Arbeiten wurde grundsätzlich Ampullenwasser verwendet.

3.2.1 DNA-Aufreinigung

DNA-Aufreinigungen wurden mit dem „QIAamp DNA Mini Kit“ durchgeführt. Alle Waschschritte wurden zweimal durchgeführt um PCR-Inhibitoren gut auszuwaschen. Die Elution erfolgte grundsätzlich in 50 µl EB Puffer.

Blutproben, Knochenmarkproben und Zellkulturproben sowie sortierte Zellpopulationen wurden nach dem Protokoll „DNA Purification from Blood or Body Fluids” durchgeführt, wobei jeweils 200 µl Probenmaterial eingesetzt wurden.

Für die DNA-Extraktion aus soliden Organen wurden 80 µl einer entsprechend Abschnitt 3.4.4 hergestellten Suspension abgenommen und mit 100 µl ATL-Puffer sowie 20 µl Proteinase K über Nacht bei 56 °C inkubiert. Die weiteren Schritte wurden nach dem Protokoll „DNA Purification from Tissues“ durchgeführt.

3.2.2 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

DNA-Konzentrationen wurden mit dem NanoDrop Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

3.2.3 *Realtime*-PCR (qPCR)

qPCRs wurden im Rahmen dieser Arbeit für die Quantifizierung erregerspezifischer DNA eingesetzt. Die Entwicklung der routinemäßig eingesetzten *traD*-PCR ist im Abschnitt 4.1.2 beschrieben, im Entwicklungsprozess wurden alle im Kapitel „Material" verzeichneten *traD-primer* getestet. Für die Evaluation der *traD*-PCR und für die Bestimmung der Anzahl erfasster *traD*-Allele (Multiplizität) wurde die von Kramme *et al.* beschriebene 56kDa-PCR [2] benutzt.

Alle Reagenzien außer den DNA-Proben (*mastermix*) wurden entsprechend Tabelle 3.2.1 auf Eis angesetzt und zu je 8 µl in Wells einer 96 Well oder 384 Well Rundbodenplatte vorgelegt.

Tabelle 3.2.1: qPCR-*mastermixe*. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die benötigten Volumina für eine Probe.

Reagenz	**56 kDa (µl)**	***traD* (µl)**
Ampullenwasser	5,45	5,4
Polymerasepuffer (10×)	1	1
dNTPs (10 mM)	0,2	0,2
primer (10 µM)	0,6 (Tsu_S1)	0,6 (*traD*_fw)
primer (10 µM)	0,6 (Tsu_AS1)	0,6 (*traD*_rv)
SYBR green Lösung	0,1	0,1
BSA		0,05
HotStar Taq Polymerase (5 U/µl)	0,05	0,05

Je 2 µl der DNA-Proben in einer Konzentration von 5 ng/µl (DNA aus Blut- und Zellkulturproben) bzw. 10 ng/µl (DNA von Proben aus soliden Organen und Knochenmark) wurden hinzugegeben. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Auf jeder Platte wurden zusätzlich in Quadruplikaten linearisierte Standardplasmide gemessen, welche eine bekannte Anzahl Genkopien enthielten, die aufgrund der gemessenen Konzentrationen der Plasmid-DNA und des bekannten Molekulargewichts der Plasmide bestimmt wurde. Alle qPCRs wurden mit dem folgenden Temperaturzyklus durchgeführt:

Tabelle 3.2.2: qPCR-Temperaturprofil der qPCRs.

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1×	95 °C	15 min
45×	94 °C	10 sec
	58 °C	15 sec
	72 °C	20 sec
1×	60 bis 75 °C	0,6 °C/sec

Die Auswertung erfolgte nach der „*absolute quantification, 2nd derivate maximum*"-Methode mit Bezug auf eine externe Standardkurve, die durch Messung der titrierten Standardplasmide in Quintuplikaten erzeugt wurde. Die Messwerte wurden unter Berücksichtigung der ermittelten Multiplizität (21,6 *traD*-Allele pro Genom) als Genomkopien pro µl eingesetzte Gesamt-DNA angegeben.

Bestimmung der Multiplizität der *traD*-PCR

Da *O. tsutsugamushi* multiple *traD*-Allele enthält wurde der DNA-Extrakt einer Zellkulturprobe in Quintuplikaten sowohl mit der 56kDa-PCR als auch mit der *traD*-PCR durchgeführt. Die mit der *traD*-PCR ermittelte Kopienzahl wurde durch die mit der 56kDa-PCR ermittelte Kopienzahl geteilt. Es ergab sich eine Multiplizität von 21,6.

Herstellung des *traD* Standardplasmids

Die Herstellung des *traD* Standardplasmids wurde nach molekularbiologischen Standardarbeitsmethoden durchgeführt und wird hier nur in Kürze dargestellt:

Der DNA-Extrakt einer infizierten Zellkulturprobe wurde als *template* benutzt um mit einer konventionellen PCR unter Verwendung der Platinum Taq DNA Polymerase eine *traD*-Sequenz zu amplifizieren. Die Größe des PCR-Produkts wurde durch Elektrophorese in einem Agarose-Gel überprüft. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit dem „TOPO TA Cloning Kit" nach Herstellerangaben in ein pCR2.1-Plasmid kloniert. Einzelne Kolonien wurden in LB-Medium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 0,5 ml der bakteriellen Suspension wurden für die Herstellung von Glycerolstocks genutzt. Von der übrigen Suspension wurde eine Plasmidaufreinigung mit dem „QIAGEN Plasmid Mini Kit" nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Größe des Plasmids wurde durch Elektrophorese in einem Agarose-Gel überprüft. Das *insert* des Plasmids wurde durch die Fa. Eurofins MWG, Ebersberg, sequenziert, die Sequenz ist im Anhang abgebildet. Das Plasmid wurde unter Verwendung der Restriktionsendonuklease HindIII linearisiert und endständige Phosphatreste wurden mit

Alkaliner Phosphatase (*Shrimp*) nach Herstelleranleitung abgetrennt, um eine Rezirkulation des Plasmids zu verhindern. Das Produkt wurde anschließend mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Herstellerangaben aufgereinigt, wobei es in EB-Puffer eluiert wurde. Zuletzt wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und auf 1,7 ng/µl in EB-Puffer verdünnt. Für die Verwendung als Standard in der traD qPCR wurde das Produkt 1:10^5 in EB-Puffer verdünnt.

Probit-Analyse

Die Sensitivität von qPCRs wurde mittels probit-Analyse bestimmt. Dazu wurde der DNA-Extrakt einer infizierten Zellkulturprobe halblogarithmisch seriell verdünnt und mindestens in acht Replikaten je Verdünnungsstufe in der qPCR gemessen. Die 95 %igen Nachweisgrenzen wurden mit der Software PriProbit bestimmt.

3.2.4 Herstellung lentiviraler Partikel

Die Herstellung lentiviraler Partikel erfolgte modifiziert nach Weber *et al.* [142]. Je 5×10^6 HEK293t Zellen in 10 ml DMEM-Vollmedium wurden in Petrischalen ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden für jede Petrischale (jeweils fünf Schalen für den iC2-47kDa- und den iC2-56kDa- bzw. eine Schale für den C2-Vektor) 20 µg Vektorplasmid (iC2-47kDa, iC2-56kDa oder C2), 10 µg Gag/Pol-Plasmid, 5 µg Rev-Plasmid und 2 µg Env-Plasmid in 437,5 µl Ampullenwasser angesetzt. Danach wurden 62,5 µl einer 2 M $CaCl_2$-Lösung hinzugefügt. Anschließend wurden 500 µl HBS (2×) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und die Plasmidlösung tropfenweise hinzugefügt, während mit einer Pasteurpipette die Lösung mit Luft durchströmt wurde. Die Lösung wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium auf den Zellen wurde durch 10 ml DMEM-Vollmedium mit 25 µM Chloroquin ersetzt und die DNA-Lösung wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden ca. 6 h kultiviert, anschließend wurde das Medium gegen 5 ml DMEM-Vollmedium (iC2-47kDa und iC2-56kDa) bzw. 8 ml DMEM-Vollmedium (C2) getauscht. Nach 21 h wurden die Überstände abgenommen und gleiche Überstände vereint. Die Überstände wurden durch 0,45 µm Sterilfilter filtriert und die Überstande der iC2-47kDa und iC2-56kDa transfizierten Makrophagen wurden à 2 ml in 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, 2 h bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert und jeweils 1,8 ml pro Reaktionsgefäß abgenommen. Die restlichen 0,2 ml je Reaktionsgefäß wurden wieder vereint und für die Transduktion verwendet, die sich direkt anschloss.

3.3 Biochemische Arbeiten

3.3.1 Zytokin-ELISA

Zytokine in Zellkulturüberständen wurden mittels Sandwich-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) quantifiziert. Die Durchführung erfolgte mit den Reagenzien der „DuoSet ELISA Kits“ der Fa. R&D Systems. Die Antikörper, Standards und Reagenzien wurden nach Herstellerangaben verdünnt. Zunächst wurden 96 Well ELISA-Platten mit 50 µl je Well des verdünnten Fangantikörpers durch über Nacht Inkubation bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurden die Platten dreimal in Waschpuffer gewaschen, 2 h bei Raumtemperatur mit 100 µl je Well Blockpuffer inkubiert und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden die Platten dreimal gewaschen und die Wells mit 50 µl der verdünnten Standards in Duplikaten bzw. mit 40-50 µl der Kulturüberstände in Triplikaten (mindestens Duplikate bei Lymphknoten aus nicht infizierten Tieren) beschickt. Die Inkubation erfolgte 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Platten dreimal gewaschen, mit 50 µl je Well verdünntem Detektionsantikörper beschickt und 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Platten mit 50 µl je Well verdünntem Streptavidin-HRP 20 min bis 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal gewaschen und mit 100 µl je Well TMB-Substrat inkubiert. Nach ca. 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl Stopplösung beendet und die Farbreaktion bei 450 nm im Plattenphotometer gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer Standardkurve, die aufgrund der Messwerte für die mitgeführten Standards durch sigmoidale Regression berechnet wurde.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot

Für die Identifikation von abundanten *O. tsutsugamushi* Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) eines Lysats aus aufgereinigten *O. tsutsugamushi* (Abschnitt 3.1.5, Material aus zwölf 75 cm^2 Zellkulturflaschen infizierter Vero-Zellen, zuletzt in 200 µl PBS aufgenommen) durchgeführt und mit Coomassie gefärbt. Proteine, die eine starke Antikörperantwort hervorrufen, wurden mittels Westernblot identifiziert.

SDS-PAGE

162 µl PBS, 18 µl Bakteriensuspension und 45 µl Lämmli-Puffer mit DTT wurden gemischt und 10 min bei 95 °C inkubiert. 4 µl Größenstandard bzw. 15 µl der Probe wurden in die Taschen von 12,5 %igen SDS-PAGE Gelen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 50 mA für zwei Gele durchgeführt. Danach wurden die Gele entweder für Westernblots genutzt oder mit Coomassie gefärbt.

Coomassie-Färbung

Die Gele wurden erst 20 min in Coomassie Färbelösung und anschließend in Coomassie Entfärbelösung inkubiert. Die Entfärbelösung wurde mehrfach erneuert, bis im Hintergrund keine blaue Färbung mehr erkennbar war. Das Bandenmuster wurde anschließend mittels Photoscanner digitalisiert.

Westernblot

Die Proteine in einem SDS-PAGE Gel wurden nach Standardlabormethoden elektrisch auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch über Nacht Inkubation bei 4 °C in Blockpuffer blockiert. Anschließend wurden einzelne Laufstreifen der Membran getrennt und mit Blockpuffer + 1:500 Serum einer infizierten Balb/c Maus bzw. mit Blockpuffer + 1:50 anti-56kDa Hybridomüberstand 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranstreifen wurden dreimal 5 min in Blockpuffer gewaschen und 1 h in Blockpuffer + 1:1000 anti-Maus-IgG-HRP inkubiert. Danach wurden die Streifen dreimal in Blockpuffer und zweimal in Wasser gewaschen, anschließend mit ECL-Substrat nach Herstellerangaben inkubiert und das Bandenmuster auf Fotofilm übertragen.

3.4 Tierexperimentelle Arbeiten

Die Tierexperimente wurden von der Hamburger Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt (Genehmingungs-Nr.: 74/09) und entsprechend der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Tiere wurden im BNI in individuell belüfteten Käfigen (*individually ventilated cages, IVC*s) im L3* Tierlabor gehalten. Käfige mit infizierten Tieren wurden ausschließlich unter L3-Bedingungen geöffnet. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere 7-10 Wochen alt (außer OT-I-Mäuse: ca. 4 Monate). Soweit nicht anders angegeben wurden weibliche Mäuse verwendet.

3.4.1 Infektion und Injektion von L929-Kontrollzellen

Infektiöse Inokulate bzw. L929-Kontrollinokulate wurden zügig in der Hand aufgetaut, anschließend wurde tropfenweise 1 ml $R5F^{-G}$ zu jedem Röhrchen hinzugefügt. Danach wurde die Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen übergeführt und langsam 8 ml $R5F^{-G}$ hinzugefügt. Die Zellen wurden zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen (Zentrifugationen 5 min bei 1200 rpm), die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße übergeführt. Die Zellen wurden bei 8000 rpm pelletiert und im benötigten Endvolumen aufgenommen.

Für die subkutane Injektion wurde den Mäusen zuerst intraperitoneal 10 µl/g Körpergewicht einer Ketamin/Xylazin-Lösung injiziert. Sobald die Mäuse keine Reflexe am Fuß mehr zeigten wurden 50 µl des Inokulats mit einer 27 Gauge-Kanüle in die rechte Fußsohle injiziert.

3.4.2 Injektion von Antikörpern und Peptiden

Für die Depletion von $CD8^+$ T-Zellen wurden den Tieren wöchentlich 200 µl einer 2,5 µg/ml Antikörperlösung intraperitoneal injiziert.

Für die Neutralisierung von IFN-γ wurde den Tieren einmalig 1 ml einer 1 mg/ml Antikörperlösung intraperitoneal injiziert.

Für die Immunisierung einer OT-I Maus wurden dem Tier zwei Tage vor dem Experiment 20 µg SIINFEKL-Peptid in 200 µl PBS intraperitoneal injiziert.

3.4.3 Blutabnahme für die qPCR

Für die Bestimmung der Bakteriämie wurde den Tieren Blut aus der Schwanzspitze abgenommen. Dazu wurden 1-2 mm der Schwanzspitze kupiert und 40-50 µl des austretenden Bluttropfens mit einer Glaskapillare aufgenommen. Das Blut wurde mit 150 µl PBS vermischt und entsprechend Abschnitt 3.2.1 weiterverarbeitet.

3.4.4 Präparation von Organen

Entnommene Organe wurden in 6 Well Platten in $R5F^{-G}$ auf Eis gelagert.

Sofern keine Präparation der Lungen erforderlich war, wurden die Tiere durch CO_2-Narkose mit anschließendem Genickbruch getötet.

Sofern auch eine Präparation der Lungen erforderlich war, wurde den Mäusen zuerst intraperitoneal 15 µl/g Körpergewicht einer Ketamin/Xylazin-Lösung injiziert. Sobald die Mäuse keine Reflexe mehr zeigten, wurde die Bauchdecke geöffnet und die *Vena cava posterior* angeschnitten, um die Mäuse zu entbluten. Anschließend wurde das Diaphragma angeschnitten, so dass die Lunge kollabierte. Danach wurde der Brustsitus geöffnet und der rechte Herzventrikel mit einer 18 Gauge Kanüle angestochen. Eine Knopfkanüle wurde durch das Loch in den rechten Ventrikel eingeführt und an den Eingang der *Arteria pulmonalis* vorgeschoben. Anschließend wurde die Lunge durch die *Arteria pulmonalis* mit 3-5 ml PBS gespült. Danach wurde zuerst die Lunge, dann die mediastinalen Lymphknoten und anschließend weitere Organe entnommen.

Präparation von Organen für die Bestimmung der Bakterienlast in soliden Organen

Lunge, Milz, Gehirn, rechter poplitealer Lymphknoten, Nieren, Leber und Darm wurden entnommen. Der Darm wurde zunächst in Dünndarm, Blinddarm und Dickdarm getrennt, die einzelnen Abschnitte mit PBS gespült und anschließend alle Teile zusammen weiterverarbeitet. Die Organe wurden fein zerschnitten und 25-50 mg Milz bzw. 50-100 mg Gewebestückchen aller anderen Organe in Precellys-Röhrchen übergeführt. 500 µl PBS wurden hinzugefügt und die Gewebe 2×15 sec bei 6600 rpm im Homogenisator (Precellys) lysiert. Anschließend wurden die Proben entsprechend Abschnitt 3.2.1 weiterverarbeitet.

Präparation von Knochenmark für die Bestimmung der Bakterienlast

Die Oberschenkelknochen und Schienbeine wurden entnommen, von Muskeln befreit, 2 min in Isopropanol inkubiert und zum Trocknen gelegt. Anschließend wurden die Knochen an beiden Seiten kupiert und das Knochenmark durch 27-Gauge Kanülen mit 3 ml $R5F^{-G}$ ausgespült. Die Suspension wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen übergeführt und 2 min stehen gelassen, so dass Knochensplitter sedimentierten. Anschließend wurde der Überstand in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen übergeführt, die Zellen pelletiert, in 200 µl PBS resuspendiert und anschließend entsprechend Abschnitt 3.2.1 weiterverarbeitet.

Präparation von Lungen für die Histologie

Für die Herstellung histologischer Schnitte mussten die Luftwege der Lunge mit Flüssigkeit gefüllt werden, um die Struktur des Lungengewebes zu erhalten. Dazu wurden die Mäuse wie in diesem Abschnitt bereits beschrieben anästhesiert, entblutet und die Lungen mit PBS perfundiert. Anschließend wurde ein kutaner Längsschnitt vom Unterkiefer bis zur oberen Thoraxapertur geführt und die Trachea freigelegt. Die Trachea wurde transversal angeschnitten, eine Knopfkanüle in die Trachea eingeführt und mit einem Faden fixiert. Ca. 0,7 ml

4 %iges PFA wurde in die Lunge injiziert, die Lunge komplett freigelegt, entnommen und in 4 %igem PFA fixiert. Die Herstellung Hämatoxylin und Eosin gefärbter Schnitte erfolgte in Kooperation am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Glatzel.

3.4.5 Überlebenskurven

Tiere wurden als „tot“ gewertet, wenn sie die Abbruchkriterien gemäß Tierversuchsgenehmigung erfüllten. Die Tiere wurden dann sofort schmerzlos getötet.

3.5 Darstellung und Statistik

Bilder wurden mit der Software Gimp bearbeitet. Dabei wurden die Werkzeuge „Entsättigen“, „Helligkeit/Kontrast“, „Tonwertkorrektur“ sowie für die Darstellung des *Immunofocus*-Assays „Invertieren“ und der Filter „Kanten finden (Sobel)“ eingesetzt.

Die Darstellung und statistische Auswertung von Messwerten erfolgte mit der Software GraphPad Prism. Die dargestellten statistischen Kenngrößen und Tests können den Abbildungslegenden entnommen werden.

qPCR Daten wurden in der Regel als $lg\ (1 + {}^{O.\ tsu\ Äq.}/_{1\ \mu g\ DNA})$ angegeben. Die Logarithmierung stellt eine näherungsweise Normalverteilung der Daten her. Die Addition von „1“ ermöglicht, dass auch der Messwert „0“ einbezogen wird, die Bezugsgröße „1 µg DNA“ wurde so gewählt, dass die Addition von „1“ keinen relevanten Einfluss auf kleine Messwerte hat.

Kapitel 4: Ergebnisse

4.1 Etablierung und Charakterisierung eines Infektionsmodells

Grundlage für die immunologischen Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, war die Etablierung eines nicht-letalen Infektionsmodells von *O. tsutsugamushi* in der BALB/c-Maus sowie einer qPCR zur Quantifizierung erregerspezifischer DNA. Das Modell wurde bezüglich sichtbarer Krankheitsanzeichen, Erregerlast in verschiedenen Organen und histologischer Veränderungen beschrieben. Infizierte Gewebestrukturen wurden identifiziert und die Erregerlast verschiedener *ex vivo* isolierter Zellpopulationen quantifiziert.

4.1.1 Etablierung eines Infektionsmodells

Die Infektionsroute sowie die Art und Dosis des infektiösen Inokulats wurden so gewählt, dass eine natürliche Infektion gut reflektiert wurde und der Infektionsverlauf reproduzierbar war.

Infektionsroute

Die natürliche Infektion von Nagetieren mit *O. tsutsugamushi* erfolgt durch den Biss von infizierten Laufmilben. Histologische Untersuchungen von Hautläsionen bei Menschen zeigten, dass die Bakterien zunächst Zellen in der Dermis befallen [31]. Eine artifizielle intradermale Applikation ist zum einen schmerzhaft für die Tiere, zum anderen ist sie methodisch anspruchsvoll und auf eine kleine Substanzmenge beschränkt, wodurch eine schlechte Reproduzierbarkeit zu erwarten ist [147]. Daher erfolgten die Infektionen subkutan in die rechten Hinterpfoten. Ein weiterer Vorteil dieser Applikationsform ist, dass eine zu erwartende lokale Immunreaktion in den drainierenden poplitealen Lymphknoten untersucht werden kann.

Inokulate

Die Verwendung infektiöser Inokulate aus Zellkulturen birgt die Gefahr einer Immunmodulation durch Bestandteile der Wirtszellen. Um einen solchen Effekt zu vermeiden wurden erste Infektionsversuche mit aufgereinigten *O. tsutsugamushi* Inokulaten durchgeführt.

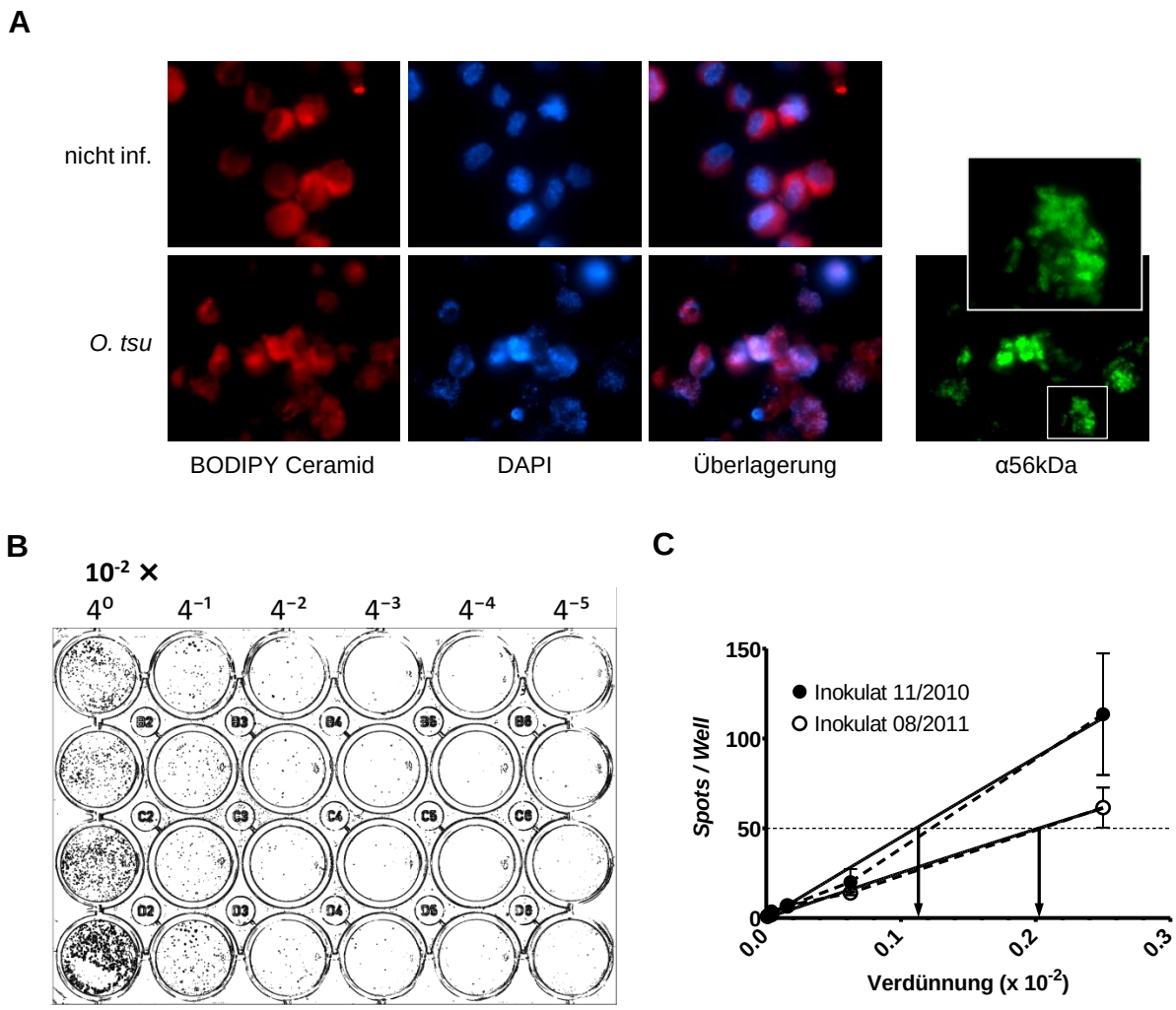


Abb. 4.1.1: infektiöse Inokulate.

(A) Gezeigt sind Immunfluoreszenzaufnahmen von nicht infizierten oder mit *O. tsutsugamushi* infizierten L929-Zellen 3 Wochen p.i. Der Farbstoff BODIPY Ceramid integriert in eukaryotische Membranen. Objektivvergrößerung: 100×. **(B)** *Immunofocus*-Assay. Irradiierte L929-Zellen wurden mit einem Inokulat (11/2010) infiziert und 14 Tage in Methylcellulose-Medium inkubiert. Das Inokulat wurde in den angegebenen Verdünnungen in vier Replikaten eingesetzt. Infizierte *Spots* wurden unter Verwendung eines α56kDa mAk gefärbt und die *Wells* einzeln ausgezählt. **(C)** Bestimmung der benötigten Inokulat-Verdünnung. Die Infektiositäten der Inokulate, hergestellt 11/2010 bzw. 08/2011 wurden mittels *Immunofocus*-Assay bestimmt. Die gezählten *Spots* pro *Well* wurden gegen die Inokulat-Verdünnung aufgetragen (gestrichelte Linien). Zusätzlich wurden Regressionskurven (einphasige logarithmische Assoziation) berechnet (durchgehende Linien). Die Pfeile zeigen die Verdünnung an, welche 50 *Spots* pro *Well* hervorrufen (= 50 *spot-forming-units)*. nicht inf.: nicht infiziert; α56kDa: mAk gegen das 56 kDa *O. tsutsugamushi* Oberflächenprotein.

Dazu wurden die Inokulate durch mechanische Lyse von infizierten Vero-Affennierenzellen bzw. L929-Mausfibroblasten sowie anschließender differentieller Zentrifugation der resultierenden Suspension hergestellt. Die Verwendung dieser Inokulate führte zu keiner verlässlichen Infektion (Daten nicht abgebildet). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher infizierte, irradiierte L929-Zellen als infektiöse Inokulate verwendet.

Bei immunologischen Experimenten wurden nicht infizierte L929-Zellen in Kontrollmäuse injiziert, um einen möglichen Einfluss von Wirtszellbestandteilen zu kontrollieren. Infizierte L929-Zellen zeigten, im Vergleich zu nicht-infizierten, in der Immunfluoreszenz eine unregelmäßige Zell- und Kernmorphologie, was auf eine funktionelle Beeinträchtigung der Zellen hindeutet (Abb. 4.1.1 A). Ein immunologischer Einfluss des beschädigten Wirtszellmaterials kann formal nicht ausgeschlossen werden, sondern ist dem Modell inhärent.

Infektiöse Inokulate wurden chargenweise hergestellt und aliquotiert in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Infektiosität wurde für jede Charge mit Hilfe eines *Immunofocus*-Assays bestimmt. Hierzu wurden irradiierte L929-Zellen mit verschieden Inokulatverdünnungen infiziert und anschließend 14 Tage in Methylcellulose-Medium inkubiert, welches durch seine hohe Viskosität die Ausbreitung der Bakterien auf dem Zellrasen lokal eingrenzte. Infizierte Bereiche im Zellrasen (*Spots*) wurden mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (mAk) gegen das abundante 56 kDa *O. tsutsugamushi* Oberflächenprotein angefärbt und gezählt (Abb. 4.1.1 B, exemplarisch). Die gezählten *Spots* wurden gegen die Inokulatverdünnungen aufgetragen, und es wurden Regressionskurven nach einphasiger logarithmischer Assoziation bestimmt (Abb. 4.1.1 C). Der Anteil eines Inokulats, bei welcher 50 infektiöse *Spots* pro *Well* enstehen, enthält per Definition die Infektiositäts-Einheit 50 *spot-forming-units* (*sfu*). Zwei Inokulat-Chargen, deren Infektiositäten vorab *in vitro* durch den *Immunofocus*-Assay bestimmt wurden, verursachten einen vergleichbaren Infektionsverlauf *in vivo*, wenn jeweils 5000 *sfu* eingesetzt wurden (Daten nicht abgebildet).

4.1.2 Entwicklung einer *O. tsutsugamushi* spezifischen Multikopien-qPCR

Die Erregerquantifizierung ist eine wichtige Messmethode für viele Fragestellungen eines Infektionsmodells. Eine zuverlässige Erregerquantifizierung ist notwendig um Einflussfaktoren auf die Erregerproliferation und die Immunabwehr gegen den Erreger zu untersuchen. In Vorversuchen wurden die Erregerlasten im Blut und in verschiedenen Organen von BALB/c Mäusen mit Hilfe einer qPCR untersucht, die eine Sequenz des 56 kDa Gens amplifiziert [2]. Es zeigte sich, dass die Sensitivität dieser PCR nicht genügte, um die Erregerlast im zeitlichen Verlauf der Infektion zuverlässig zu bestimmen (Daten nicht abgebildet). Aus diesem Grund sollte eine neue, sensitivere qPCR zur Quantifizierung von *O. tsutsugamushi* entwickelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem bisher unsequenzierten Karp Stamm gearbeitet. Für die Ableitung von *Primer*-Bindungsstellen war es daher nötig, auf die in der NCBI-Datenbank

hinterlegten Sequenzen der Stämme Ikeda und Boryong zurückzugreifen [18, 19] und die Anwendbarkeit der *Primer* im Karp-Stamm experimentell zu ermitteln. *O. tsutsugamushi* verfügt über eine Reihe von Genen, welche in multiplen Allelen im Genom vorkommen [19], was die Möglichkeit eröffnete eine qPCR zu entwickeln, die multiple Allele eines Gens erfasst und deshalb sensitiver ist. Hierzu gehören Gene des Typ IV Sekretionssystems wie *traD*, welches die größte Multiplizität (59 Allele im Stamm Ikeda) bei gleichzeitig hoher Homologie zwischen den Allelen aufweist. Homologe Sequenzen zwischen den *traD*-Allelen stellen daher eine attraktive Zielsequenz für eine sensitive qPCR dar. Für die Stämme Ikeda und Boryong wurden phylogenetische Stammbäume der *traD*-Allele mit der Software JalView erstellt. Auf diese Weise konnte eine Gruppe von 23 Allelen (Ikeda) bzw. 26 Allelen (Boryong) identifiziert werden, die eine besonders große Homologie zueinander aufweisen. Aus diesen Allelen wurden in einem Alignment mögliche konservierte *Primer*-Bindungsstellen bestimmt. Aus mehreren *Primer*-Kandidaten wurden nach qPCR Testläufen die *Primer* IIIb und VIa für die qPCR ausgewählt, da diese die größte Zahl von *traD*-Allelen in *O. tsutsugamushi* Karp DNA erkannten. Die Durchführung und Auswertung der traD-qPCR ist in Kapitel 3 näher beschrieben.

Der Vorteil einer Multi-Kopien qPCR kommt nur dann zum Tragen, wenn die Allele im Genom verteilt liegen und nicht gruppiert sind. Bei der DNA-Extraktion mit dem verwendeten Kit (Qiagen, Hilden) entstehen laut Herstellerangabe DNA-Bruchstücke von typischerweise 30 kbp Länge. Nur wenn die Zielsequenzen auf vielen Bruchstücken verteilt liegen, verteilen sie sich im Extrakt und werden gleichmäßig in die PCR-Reaktionsansätze einbezogen. Dies ist für die *traD*-Allele gewährleistet (Abb. 4.1.2 A).

Mit der Einzelkopien 56kDa qPCR wurde die Kopienzahl eines *O. tsutsugamushi* DNA-Extrakts bestimmt. Anschließend wurde der gleiche Extrakt mit der *traD*-qPCR gemessen. Das Ergebnis der *traD*-qPCR war um den Faktor 21,6 höher als das Ergebnis der 56kDa qPCR (Daten nicht abgebildet). Dieser Wert entspricht der Anzahl erfasster *traD*-Allele.

Um die Sensitivität der *traD*-qPCR und der 56kDa qPCR zu vergleichen wurde eine *Probit*-Analyse durchgeführt. Dazu wurde ein *O. tsutsugamushi* DNA-Extrakt mit bekannter Kopienzahl in halblogarithmischen Verdünnungsstufen titriert und mit beiden qPCRs analysiert. Der Anteil positiver PCR-Ergebnisse wurde gegen die rechnerisch bestimmte Anzahl eingesetzter Genomkopien aufgetragen und mit der Software PriProbit (Sakuma, Universität Kyoto, Japan) analysiert (Abb. 4.1.2 B). Die *Probit*-Analyse zeigte, dass die *traD*-qPCR eine ca. 100fach niedrigere 95 %ige Nachweisgrenze als die Einzelkopien 56kDa-qPCR hat.

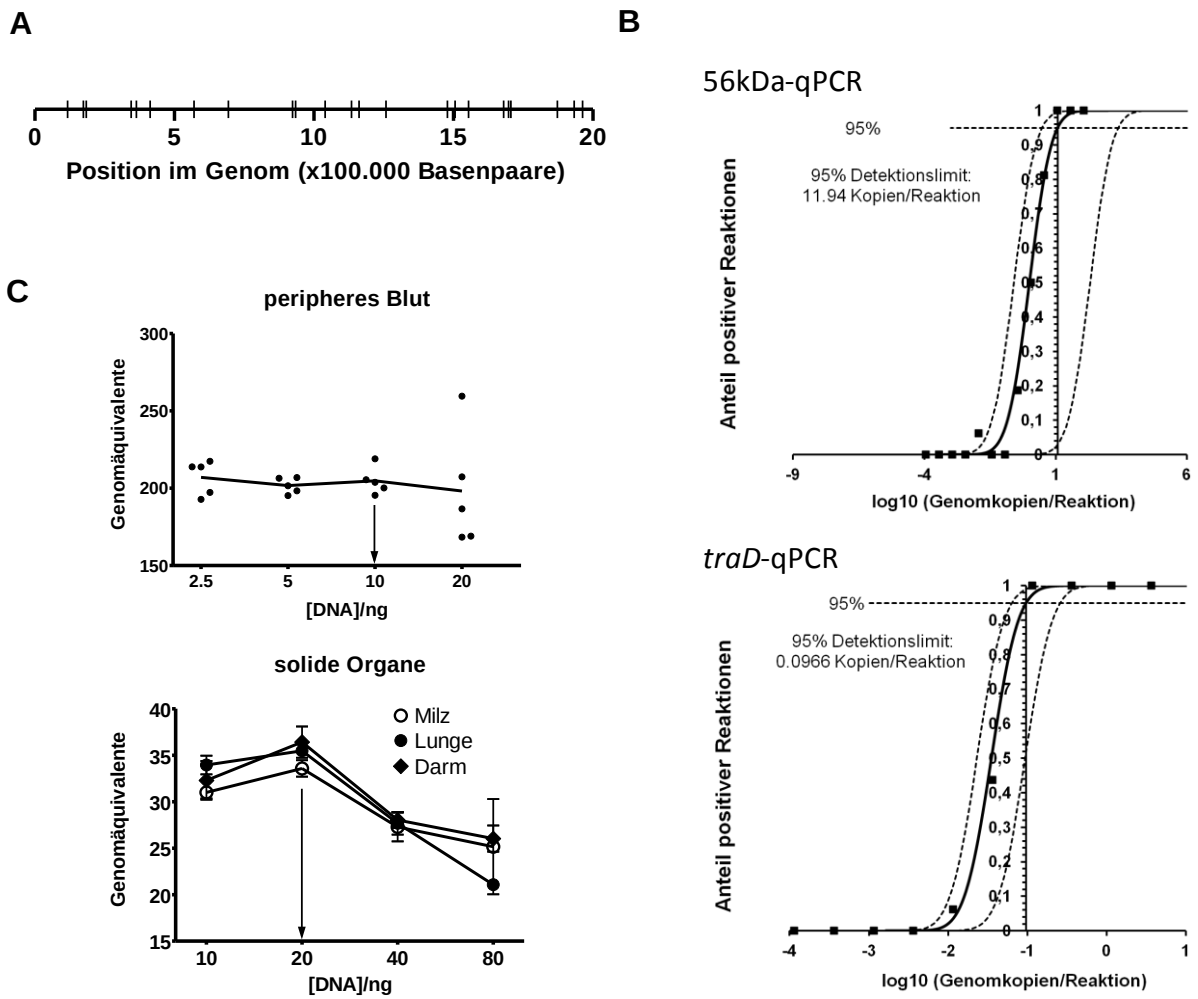


Abb. 4.1.2: Entwicklung einer *O. tsutsugamushi* spezifischen Multi-Kopien qPCR.
(A) Loci der *traD* Genfamilie sind über das gesamte *O. tsutsugamushi* Genom verteilt. Die Abb. zeigt die Positionen von den 23 *traD*-Allelen im Genom des sequenzierten Ikeda Stamms, welche Sequenzen enthalten, die eine große Homologie zu den verwendeten *Primern* (IIb und VIa) haben. **(B)** Die 95 %igen Nachweisgrenzen der 56kDa Einzelkopien qPCR [2], und der *traD* Multi-Kopien qPCR, wurden mittels *Probit*-Analyse bestimmt. Als *template* diente ein DNA-Extrakt aus einer infizierten Zellkultur. **(C)** Die höchste Konzentration eines DNA-Extraktes, bei der keine inhibitorischen Effekte auftreten, wurde in DNA-Extrakten aus nicht infizierten Mäusen bestimmt. Die Extrakte wurden mit 375 (peripheres Blut) bzw 37,5 (solide Organe) Genomäquivalenten eines *traD*-Standardplasmids versetzt. Anschließend wurde eine traD-qPCR durchgeführt. Gezeigt sind die Einzelwerte (oben; Blut; n=5) bzw. die Mittelwerte ± SD (unten, solide Organe; n=2). Pfeile zeigen die maximal einzusetzende DNA-Konzentration für Blut- (10 ng) bzw. Organproben (20 ng) an.

Mit der *traD*-qPCR sollten DNA-Proben aus verschiedenen Organen gemessen werden. Als Bezugsgröße für die qPCR-Ergebnisse diente die eingesetzte Gesamt-DNA in einer Reaktion. Um die optimale *template* Konzentration für jeden Organextrakt zu ermitteln wurden unterschiedliche DNA-Konzentrationen aus DNA-Extrakten von Blut, Milz, Lunge und Darm mit definierten Mengen eines *traD*-Standardplasmids gemischt und anschließend in der *traD*-qPCR gemessen. Es zeigte sich, dass 10 ng DNA aus Blutextrakten bzw. 20 ng DNA aus Or-

ganextrakten gerade keine Inhibition in der *traD*-qPCR verursachten (Abb. 4.1.2 C). Für jede folgende qPCR wurden deshalb diese DNA-Mengen pro qPCR-Reaktion eingesetzt.

4.1.3 Infektionsverlauf

Um Krankheitssymptome systematisch beurteilen zu können wurde ein *Score* definiert, der auf der Fellbeschaffenheit der Tiere basierte (Abb. 4.1.3 A). Anhand dieses *Scores* und anhand von Gewichtsveränderungen wurde der Infektionsverlauf von Tieren beschrieben, denen L929-Zellen bzw. 500, 5000 oder 50000 *sfu* eines *O. tsutsugamushi*-Inokulats subkutan in die rechte Hinterpfote injiziert wurden. Es zeigte sich, dass höhere Infektionsdosen schneller Krankheitssymptome hervorriefen. Während eine Infektionsdosis von 50000 *sfu* an Tag 13 p.i. zu einem maximalen *Score* führte, zeigten Mäuse, die mit 5000 *sfu* infiziert wurden erst an Tag 16 p.i. maximale Symptome (Abb. 4.1.3 B). Unabhängig von der eingesetzten Dosis zeigten alle infizierten Gruppen einen drastischen Gewichtsverlust zwischen Tag 12 und 14 p.i., der nicht bei der L929-behandelten Gruppe beobachtet wurde (Abb. 4.1.3 C).

A

Score	Beschreibung
0	glattes Fell
1	struppiges Fell hinter den Ohren und im Nacken
2	struppiges Fell im wesentlichen beschränkt auf Nacken und Rücken
3	struppiges Fell am ganzen Körper

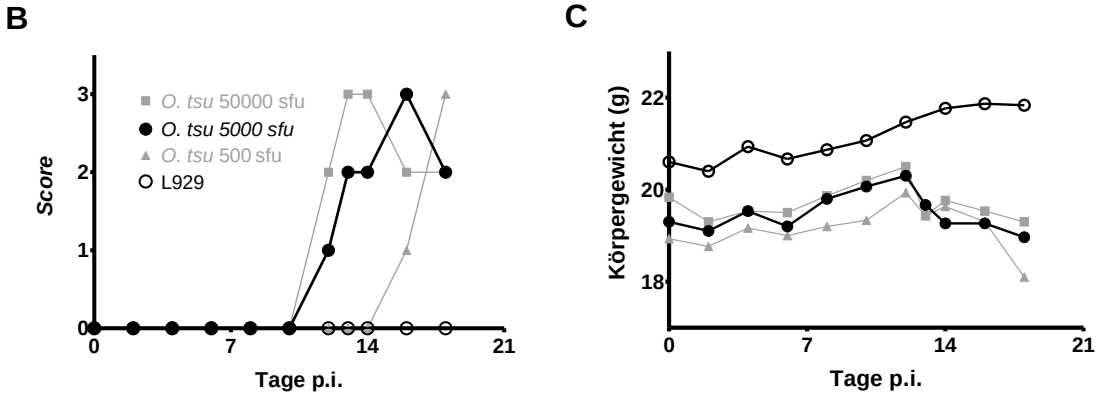


Abb. 4.1.3: Infektionsverlauf in *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Mäusen: Score, Körpergewicht.
(A) Beschreibung der Kriterien für die systematische Beurteilung der Schwere der Erkrankung, basierend auf der Beschaffenheit des Fells (*Score*). **(B)**, **(C)** Krankheitsverlauf in BALB/c Mäusen. Gezeigt ist der Verlauf der *Scores* (B) und des Körpergewichts (C) von Mäusen, denen 500, 5000 oder 50000 sfu eines infektiösen *O. tsutsugamushi* (*O. tsu*) Inokulats bzw. L929-Zellen subkutan injiziert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3). *sfu: spot forming units*.

Die Erregerlast wurde in verschiedenen Organen alle sieben Tage und im peripheren Blut zweimal wöchentlich mittels qPCR bestimmt. Im poplitealen Lymphknoten war die Erregerlast bereits an Tag 7 p.i. maximal, während in der Milz und in der Lunge erst an Tag 14 p.i. die maximale Erregerlast gemessen wurde (Abb. 4.1.4 A). Im peripheren Blut (Abb. 4.1.4 B) sowie in allen anderen untersuchten Organen (Leber, Hirn, Herz, Darm, Niere, Knochenmark; nicht abgebildet) war die Erregerlast an Tag 14 p.i. am höchsten. In der Lunge konnte die höchste Erregerlast von allen untersuchten Organen nachgewiesen werden (Abb. 4.1.4 C).

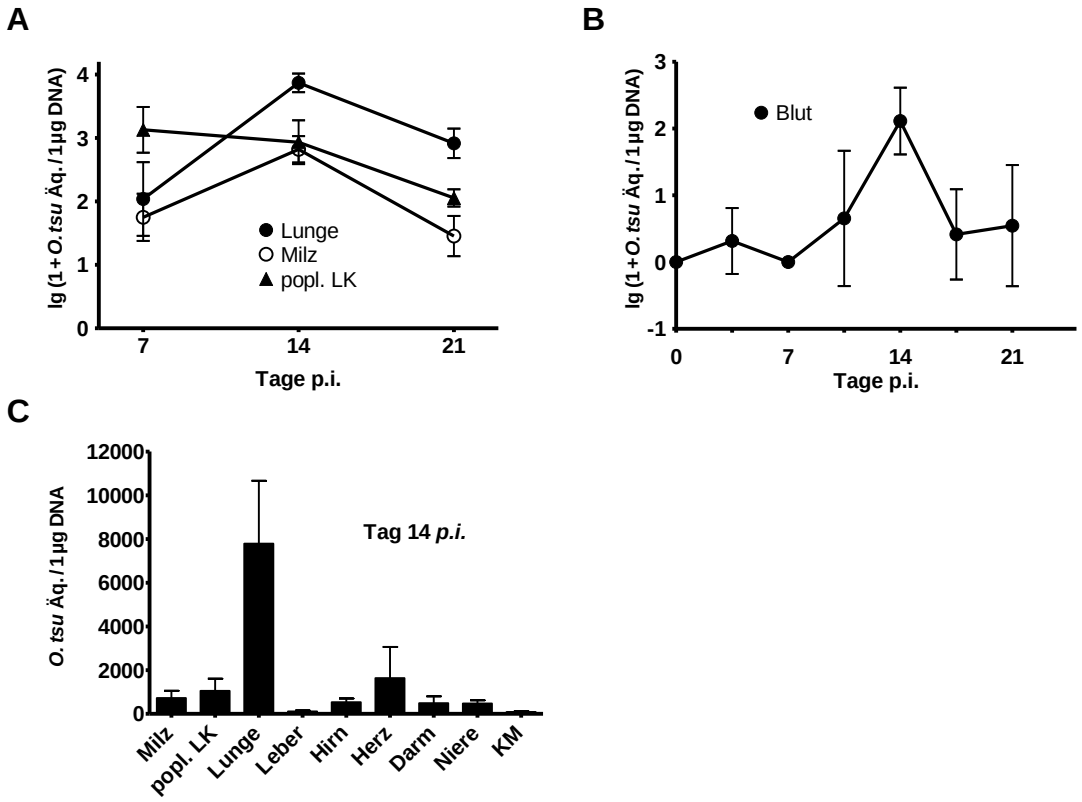


Abb. 4.1.4: Infektionsverlauf in *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Mäusen: Bakterienlasten in verschiedenen soliden Organen, im KM und im Blut.
Die Bakterienlast wurde wöchentlich (solide Organe und KM) bzw. zweimal wöchentlich (Blut) mittels *traD*-qPCR bestimmt. Gezeigt ist die Bakterienlast ausgesuchter solider Organe **(A)** sowie des peripheren Blutes **(B)** im Zeitverlauf sowie die Bakterienlast an Tag 14 p.i. für alle untersuchten soliden Organe und das KM **(C)**. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD zusammengefasster Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=6). popl. LK: poplitealer Lymphknoten; KM: Knochenmark.

4.1.4 Histopathologie

Die Lunge wurde als wichtigstes Zielorgan in der akuten Phase des Infektionsmodells identifiziert. Um die Erreger im Lungengewebe zu lokalisieren wurde die Lunge einer BALB/c Maus zum Zeitpunkt der höchsten Erregerlast, also 14 Tage p.i. immunhistologisch untersucht. Die Herstellung von Gefrierschnitten, ihre Färbung unter Verwendung eines monoklo-

nalen Antikörpers gegen das *O. tsutsugamushi* 56 kDa Oberflächenantigen, sowie die mikroskopischen Aufnahmen wurden nach Standardarbeitsmethoden von Dr. Christian Keller (BNI, Hamburg) durchgeführt. Antigenpositive bakterielle Strukturen wurden vor allem im Bereich der Pleura, vereinzelt auch im Parenchym gefunden (Abb. 4.1.5 A, C, D). Erregerantigen war außerdem halbmondförmig um Hohlgefäße zu finden, bei denen es sich vermutlich um Bronchiolen handelte (Abb. 4.1.5 B).

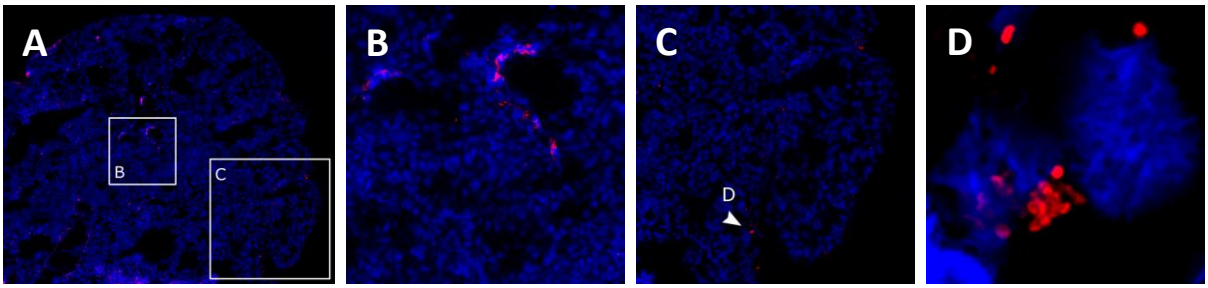


Abb. 4.1.5: Erregerlokalisierung in der Lunge.
Die Lunge von einer mit *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Maus wurde 14 Tage p.i. entnommen. Gefrierschnitte wurden hergestellt und mit DAPI sowie mit anti-56kDa mAk + anti-mouse-Alexa568 gefärbt. Antigenpositive bakterielle Strukturen wurden im Bereich der Pleura sowie vereinzelt im Parenchym gefunden **(A, C, D)**. Erregerantigen wurde zusätzlich peribronchial gefunden **(B)**. Dargestellt sind Ausschnitte von Bildern, welche mit einem Keyence-Mikroskop softwareseitig aus mehreren Einzelbildern zusammengesetzt wurden **(A, B, C)** bzw. ein Auschnitt einer Aufnahme mit einem Confocal Olympus Mikroskop **(D)**. Objektivvergrößerung: A, C: 20×; B: 60×, D: 100×.

Um pathologische Veränderungen zu untersuchen wurden Lungen von BALB/c Mäusen 7, 14 und 21 Tage p.i. histologisch untersucht. Dazu wurden die Lungen mit PBS perfundiert und tracheal mit 4 % PFA gefüllt. Dünnschnitte aus formalin-fixiertem paraffin-eingebettetem Gewebe (FFPE) wurden in Kooperation mit der Mauspathologie *Core Facility* am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Die histologischen Veränderungen waren nach 21 Tagen p.i., also nicht zum Zeitpunkt der höchsten Erregerlast am markantesten und zeigten eine chronische Bronchopneumonie mit Begleitpleuritis. Die Bronchiolen sowie Alveolen waren von entzündlichem Infiltrat umgeben, welches eine deutliche Orientierung zu den peribronchialen Blutgefäßen zeigte (Abb. 4.1.6 F). Fokale Ansammlungen intraalveolärer Infiltrate waren sichtbar, die insbesondere im Bereich kleiner Blutgefäße konzentriert waren (Abb. 4.1.6 G). Lymphozytäres Infiltrat war außerdem parenchymseitig an der Pleura sichtbar (Abb. 4.1.6 H).

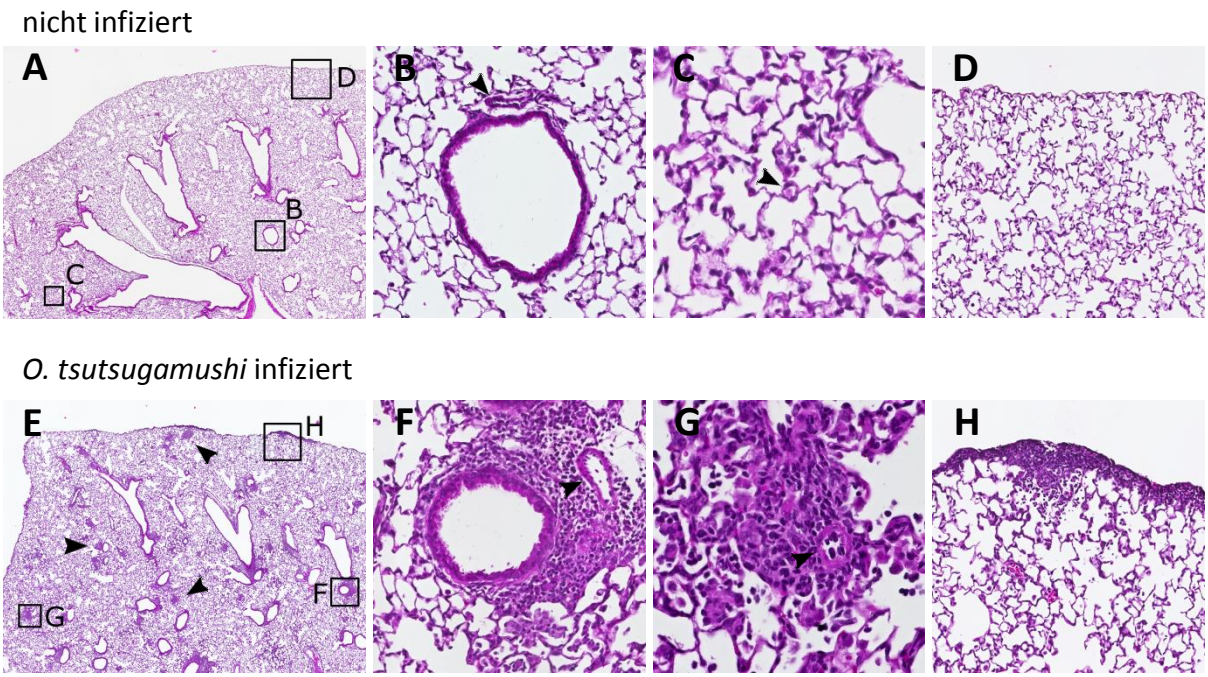
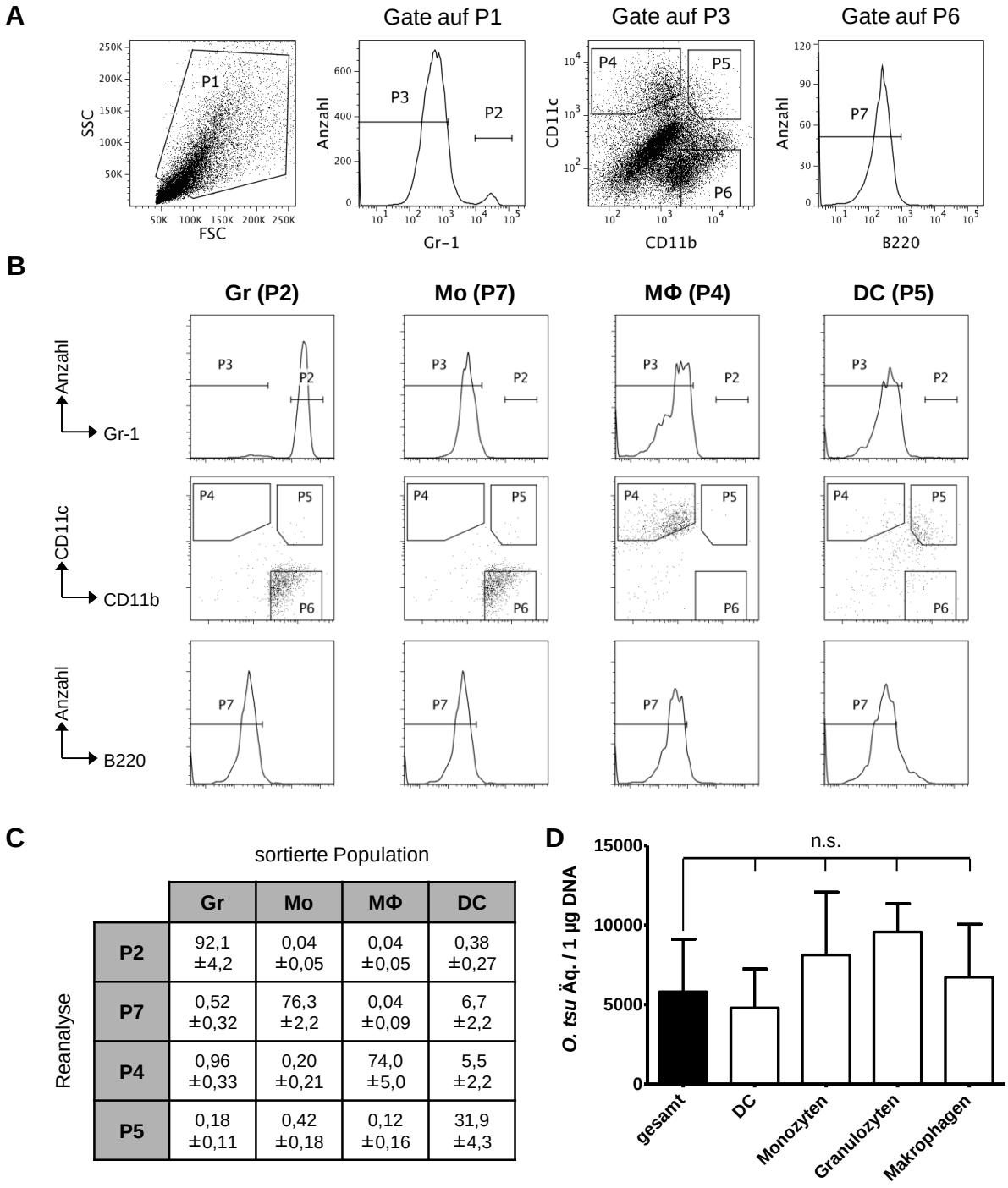


Abb. 4.1.6: Histopathologie der Lunge.
Die Lungen von je einer nicht infizierten **(A-D)** und einer *O. tsutsugamushi* infizierten **(E-H)** BALB/c Maus wurden 21 Tage p.i. entnommen. Dünnschnitte von FFPE Lungenproben wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Im Lungengewebe fielen zahlreiche lymphozytäre Herde (Pfeile) auf **(E)**. Die Bronchien waren von lymphozytärem Infiltrat umgeben welches aber deutlich in Richtung benachbarter Blutgefäße (Pfeil) orientiert war **(F)**. Lymphozytäres Infiltrat war außerdem intraalveolär zu sehen. Auch alveoläre Infiltrate zeigten sich im Bereich kleiner Blutgefäße (Pfeil) **(G)**. Parenchymseitig war an der Pleura stellenweise mononukleäres Infiltrat erkennbar **(H)**. Dargestellt sind Ausschnitte von Bildern, welche mit einem Keyence-Mikroskop softwareseitig aus mehreren Einzelbildern zusammengesetzt wurden. Objektivvergrößerung: A, E: 10×; B-D, F-H: 40×.

4.1.5 Erregerquantifizierung in *ex vivo* isolierten Zellpopulationen

Die Kenntnis der Zielzellen ist wichtig um die Ausbreitung des Erregers im Körper und im Gewebe zu verstehen, potentielle Strategien der Immunabwehr zu postulieren und Interventionsstrategien gegen den Erreger zu entwickeln. Zur Bestimmung der Zielzellen wurde ein durchflusszytometrischer Sortierungsansatz mit anschließender Quantifizierung des Erregers in den sortierten Zellpopulationen mittels qPCR gewählt. Theoretische Vorteile dieser Methode sind die hohe Sensitivität der qPCR und die gute Differenzierbarkeit verschiedener Zellpopulationen mittels spezifischer Antikörper. Des Weiteren ist diese Methode im Gegensatz zu immunhistologischen Ansätzen unabhängig von der Expression der Oberflächenantigene welche Epitope für die erregerspezifischen Antikörper beinhalten.



Reanalyse	Gr	Mo	MΦ	DC
P2	92,1 ±4,2	0,04 ±0,05	0,04 ±0,05	0,38 ±0,27
P7	0,52 ±0,32	76,3 ±2,2	0,04 ±0,09	6,7 ±2,2
P4	0,96 ±0,33	0,20 ±0,21	74,0 ±5,0	5,5 ±2,2
P5	0,18 ±0,11	0,42 ±0,18	0,12 ±0,16	31,9 ±4,3

Abb. 4.1.7: Identifikation potentieller Zielzellen in der Lunge infizierter BALB/c Mäuse.
Zellsuspensionen aus je drei Lungen von *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Mäusen (Tag 14 p.i.) wurden vereint und mit den Antikörperkonjugaten Gr-1-FITC, CD11b-PerCP/Cy5.5, CD11c-PE und B220-APC gefärbt. **(A)** Granulozyten (P2), Alveolarmakrophagen (P4), Dendritische Zellen (P5) und Monozyten (P7) wurden im Durchflusszytometer sortiert. **(B)** Durchflusszytometrische Reanalyse der sortierten Populationen. **(C)** Ergebnis der Reanalyse: Anteile der Populationen P2, P7, P4, P5 an den sortierten Zellen in % ± SD. **(D)** Die Erregerlast in der nicht sortierten Zellsuspension (gesamt) und in den sortierten Populationen wurde mittels qPCR bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Erregerlast in den verschiedenen Populationen ermittelt werden (*one-way repeated measures* ANOVA mit *Bonferroni's post test*). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus einem von zwei repräsentativen Experimenten mit 3×3 Mäusen (Daten für „gesamt" wurden nur im gezeigten Experiment erhoben). Gr: Granulozyten; Mo: Monozyten; MΦ: Alveolarmakrophagen; DC: Dendritische Zellen; n.s.: nicht signifikant.

Es ist vorstellbar, dass diese Oberflächenantigene des Erregers nach der Penetration bestimmter Zelltypen herunter reguliert werden wodurch ein Nachweis mit immunhistologischen Methoden erschwert oder unmöglich würde.

Das Experiment wurde 14 Tage p.i., also zum Zeitpunkt der höchsten Erregerlast in der Lunge durchgeführt (vgl. Abb. 4.1.4). Zellsuspensionen aus infizierten Lungen wurden mit Methanol fixiert und anschließend mit Antikörperkonjugaten gegen Gr-1, CD11b, CD11c und B220 gefärbt. Granulozyten ($Gr1^{high}$), Monozyten ($Gr1^{low}CD11b^{+}CD11c^{-}B220^{-}$), Alveolarmakrophagen ($Gr1^{low}CD11b^{-}CD11c^{+}$) und dendritische Zellen ($Gr1^{low}CD11b^{+}CD11c^{+}$) wurden per Durchflusszytometer sortiert (Abb. 4.1.7 A). Die sortierten Populationen wurden nochmals im Durchflusszytometer gemessen um die Reinheit der Populationen zu zeigen (Reanalyse, Abb. 4.1.7 B, C). Die Erregerlast in den vier sortierten Populationen sowie in Proben der nicht sortierten Zellsuspensionen wurde mittels qPCR bestimmt (Abb. 4.1.7 D). In allen untersuchten Zellpopulationen konnte Erreger-DNA mindestens in der Höhe der Gesamtzellsuspension nachgewiesen werden. Unterschiede in den Erregerlasten der untersuchten Zellpopulationen waren nicht signifikant. Tendenziell zeigten Granulozyten die höchste Erregerlast.

4.2 Charakterisierung der lymphozytären Immunreaktion gegen *O. tsutsugamushi*

Die Erregerlast in *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Mäusen steigt während der ersten zwei Wochen der Infektion stetig an und erreicht ein Maximum an Tag 14 p.i. Anschließend nimmt die Erregerlast bis zum Tag 21 p.i. wieder ab und drei Wochen nach der Infektion haben die Mäuse die Symptome weitgehend überwunden (Abb. 4.1.3 und 4.1.4). Offenbar etabliert sich in dieser Zeit also eine schützende Immunreaktion gegen den Erreger. Das zeitliche Muster mit einer effektiven Erregerbekämpfung ab Tag 14 p.i. spricht für eine Beteiligung des adaptiven Immunsystems.

4.2.1 Lymphozytäre Zusammensetzung in Milz, Lymphknoten und Lunge

Die lymphozytäre Zusammensetzung nach subkutaner Infektion in die rechte Hinterpfote wurde an Tag 0, 7, 14 und 21 p.i. im drainierenden poplitealen Lymphknoten und in der Milz bestimmt. Dazu wurden Zellen nach Färbung mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8 und B220, durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.2.1). Eine Expansion von $B220^{+}$ B-Zellen

war im poplitealen Lymphknoten bereits sieben Tage p.i., in der Milz erst 14 Tage p.i. zu sehen. Im poplitealen Lymphknoten war die Anzahl von $CD3^+$ T-Zellen sieben Tage p.i. gegenüber L929 behandelten Mäusen signifikant erhöht, anschließend aber rückläufig. In der Milz stieg die Anzahl an T-Zellen stetig. Die absolute Anzahl sowohl der $CD4^+$ T-Zellen, als auch $CD8^+$ T-Zellen waren im poplitealen Lymphknoten ab Tag 7 p.i., und in der Milz ab Tag 14 p.i. gegenüber den L929-Kontrollen erhöht (Daten nicht abgebildet). Das Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zellen im poplitealen Lymphknoten infizierter Tiere war an Tag 7 und an Tag 21, jedoch nicht an Tag 14 p.i. gegenüber L929 behandelten Tieren signifikant zu den $CD8^+$ T-Zellen verschoben. In der Milz war erst an Tag 21 p.i. das $CD4^+$ zu $CD8^+$ Verhältnis gegenüber der L929-Kontrolle signifikant zu den $CD8^+$ T-Zellen verschoben.

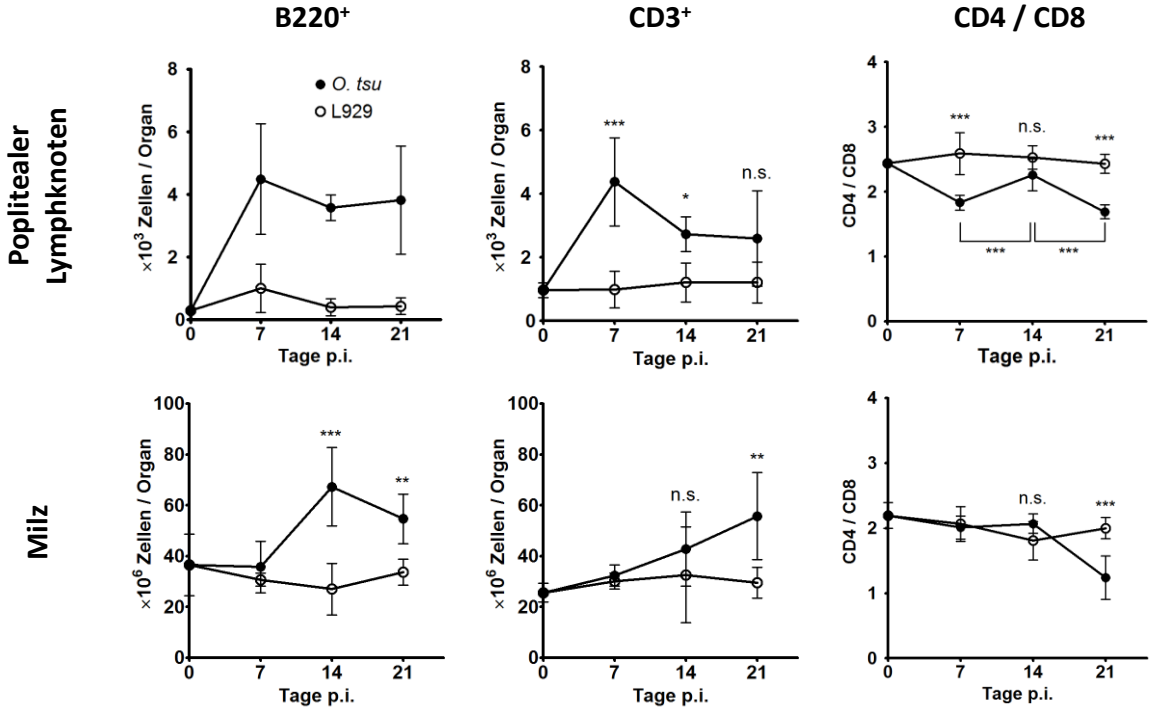


Abb. 4.2.1: Lymphozytäre Zusammensetzung im poplitealen Lymphknoten und in der Milz infizierter BALB/c Mäuse.

Zellen aus den Milzen und den poplitealen Lymphknoten unbehandelter (Tag 0) sowie infizierter (*O. tsu*) und L929 behandelter (L929) BALB/c Mäuse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und mit den Antikörperkonjugaten CD4-FITC, CD3-PE, CD8-PerCP-Cy5.5 und B220-APC gefärbt. Die Anzahl von $B220^+$ B-Zellen und $CD3^+$ T-Zellen sowie das Verhältnis von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD zusammengefasster Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=6). Die Messwerte der unbehandelten Mäuse (Tag 0) gelten sowohl für die Gruppe der infizierten, als auch für die Gruppe der L929 behandelten Mäuse. Vergleiche zwischen infizierten und L929 behandelten Tieren: *two-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test* unter Ausschluss von Tag 0. Vergleiche zwischen verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Behandlungsgruppe: *one-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test*. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

Die lymphozytäre Zusammensetzung in der Lunge für die Zeitpunkte 0, 7, 14 und 21 Tage p.i. wurde ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 4.2.2). Die Gesamtzahl der $CD3^+$ T-Zellen war an Tag 14 p.i. leicht und an Tag 21 p.i. stark erhöht, wobei das Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zellen deutlich in Richtung der $CD8^+$ T-Zellen verschoben war. Auch die Anzahl von $CD3^-DX5^+$ NK-Zellen stieg ab Tag 7 p.i. deutlich an. An Tag 21 p.i., also an einem Zeitpunkt, an dem die Akutphase der Infektion nahezu überwunden war (Abb. 4.1.3 und 4.1.4), war die maximale Expansion der $CD8^+$ T-Zellen zu sehen.

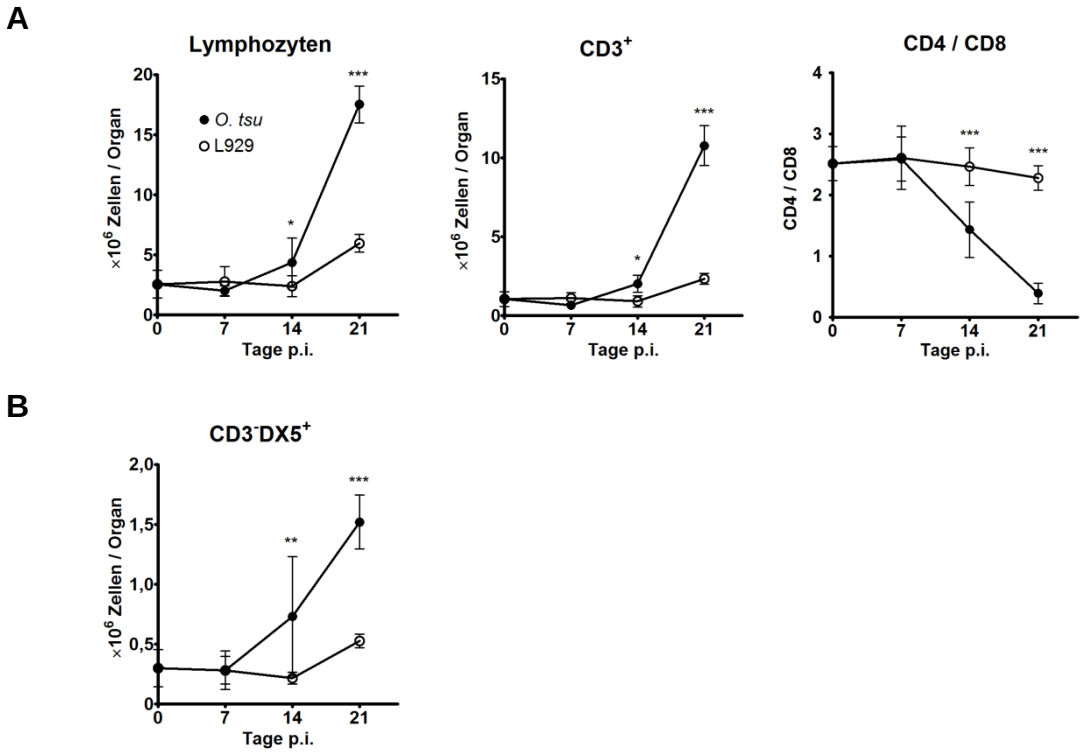


Abb. 4.2.2: Lymphozytäre Zusammensetzung in der Lunge infizierter BALB/c Mäuse.
Zellen aus den Lungen unbehandelter (Tag 0) sowie infizierter (*O. tsu*) und L929 behandelter (L929) BALB/c Mäuse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. **(A)** Die Zellen wurden mit den Antikörperkonjugaten CD4-FITC, CD3-PE und CD8-PerCP/Cy5.5 gefärbt. Durchflusszytometrisch wurden die Populationsgrößen der Gesamtlymphozyten (gemäß fsc/ssc) und der $CD3^+$ T-Zellen, sowie das Verhältnis von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen bestimmt. **(B)** Zellen wurden mit den Antikörperkonjugaten DX5-PE und CD3-PerCP/Cy5.5 gefärbt. Die Populationsgröße der NK-Zellen ($CD3^-DX5^+$) wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD zusammengefasster Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=6). Die Messwerte der unbehandelten Mäuse (Tag 0) gelten sowohl für die Gruppe der infizierten, als auch für die Gruppe der L929 behandelten Mäuse. Die Berechnung statistisch relevanter Unterschiede zwischen infizierten Mäusen und L929 Kontrollen erfolgte mittels *two-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test* unter Ausschluss von Tag 0. n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

4.2.2 Relevanz von $CD8^+$ T-Zellen

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass $CD8^+$ T-Zellen in BALB/c Mäusen während der Akutphase einer *O. tsutsugamushi* Infektion in den lymphatischen Organen und in der Lunge deutlich expandieren. Da *O. tsutsugamushi* ein obligat intrazellulärer Erreger ist welcher im Zytoplasma repliziert, ist auch eine schützende Funktion der $CD8^+$ T-Zellen zu vermuten.

Um dies genauer zu untersuchen, wurden $CD8^+$ T-Zellen vor der Infektion mit *O. tsutsugamushi* und während des Infektionsverlaufes mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD8 (YTS169) depletiert (Abb. 4.2.3 A). Die erfolgreiche Depletion konnte durchflusszytometrisch im peripheren Blut gezeigt werden (Abb. 4.2.3 B). An Tag 0 (einen Tag nach der ersten Depletion) waren weniger als 0,1 % $CD8^+$ T-Zellen vorhanden, und die Anzahl $CD3^+CD4^-$ Zellen war im Vergleich zur Ratten-IgG Kontrolle nicht erhöht, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass CD8 lediglich durch den Antikörper maskiert wurde. 65 % der depletierten und infizierten Mäuse starben bis Tag 27 p.i., aber auch 40 % der depletierten, nicht infizierten Tiere starben im gleichen Zeitraum (Abb. 4.2.3 C).

Die Erregerlast im peripheren Blut der überlebenden Tiere war in den infizierten, depletierten Mäusen ab Tag 16 p.i. signifikant höher, als in den infizierten, Ratten-IgG behandelten Mäusen (Abb. 4.2.3 D).

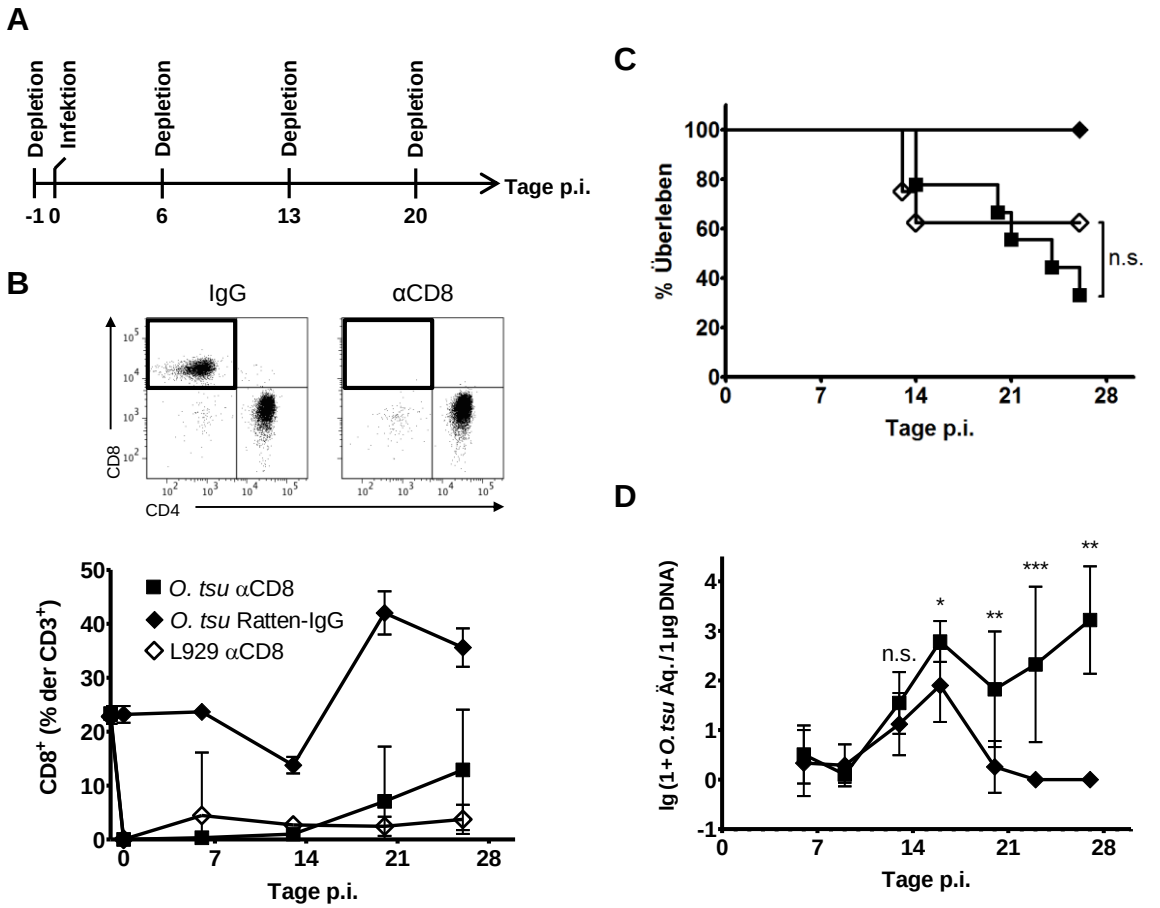


Abb. 4.2.3: Einfluss der Depletion von CD8$^+$ T-Zellen auf den Verlauf der *O. tsutsugamushi* Infektion in BALB/c Mäusen.

(A) Experimenteller Ablauf: BALB/c Mäusen wurde an Tag -1 und danach alle sieben Tage ein monoklonaler αCD8 Ak (Gruppen *O. tsu* αCD8 und L929 αCD8) bzw. Ratten-IgG (Gruppe *O. tsu* Ratten-IgG) intraperitoneal injiziert. Die Mäuse der Gruppen *O. tsu* αCD8 und *O. tsu* rat-IgG wurden an Tag 0 subkutan mit *O. tsutsugamushi* infiziert, den Mäusen der Gruppe L929 αCD8 wurden L929-Zellen injiziert. **(B)** Der Erfolg der Depletion wurde über den Anteil CD8$^+$ T-Zellen im peripheren Blut kontrolliert. Dazu wurden Blutproben mit den Antikörperkonjugaten CD4-FITC, CD3-PE und CD8-PerCP/Cy5.5 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Dotplots (oben) zeigen exemplarisch die CD3$^+$ Zellen in Blutproben einer Ratten-IgG behandelten und einer CD8-depletierten Maus an Tag 0. Der Graph (unten) zeigt die Anteile CD8$^+$ T-Zellen im Zeitverlauf. **(C)** Die Unterschiede im Überleben der Gruppen *O. tsu* αCD8 und L929 αCD8 sind nicht signifikant (Mantel-Cox Test). **(D)** Die Erregerlast im peripheren Blut der überlebenden Tiere in den Gruppen *O. tsu* αCD8 und *O. tsu* rat-IgG wurde im Zeitverlauf bestimmt. Unterschiede wurden mittels *unpaired, two-tailed* t-Tests auf Signifikanz geprüft. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD zusammengefasster Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (*O. tsu* αCD8, *O. tsu* Ratten-IgG: n=9; L929 αCD8: n=8). n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

Zusätzlich zur CD8 Depletion wurde ein Versuch mit Beta2-Mikroglobulin *knockout* ($\beta_2m^{-/-}$) Mäusen durchgeführt. Diese Mäuse exprimieren keine funktionellen MHC-I Moleküle, so dass eine positive Selektion der CD8$^+$ T-Zell Vorläufer im Thymus ausbleibt. $\beta_2m^{-/-}$ bzw. C57BL/6 Wildtyp (WT) Mäuse wurden subkutan mit *O. tsutsugamushi* infiziert (Abb. 4.2.4). 100 % der $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse starben bis Tag 21 p.i., während keine der WT Mäuse bis Tag 25 p.i.

starb (Abb. 4.2.4 A). Die Erregerlast im peripheren Blut von $\beta_2m^{-/-}$ Mäusen war, gegenüber den WT-Kontrollen, an Tag 16 p.i. signifikant erhöht. Zwischen Tag 16 und 21 p.i. war die Erregerlast in den WT-Kontrollen rückläufig, während die Erregerlast der überlebenden $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse an Tag 21 p.i. höher war als an Tag 16 p.i. (Abb. 4.2.4 B).

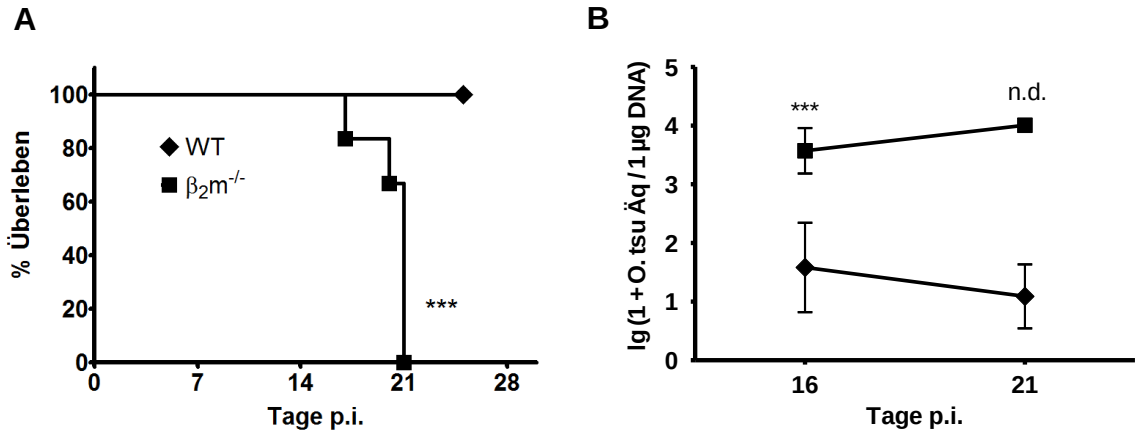


Abb. 4.2.4: Infektion von WT und $\beta_2m^{-/-}$ Mäusen im Vergleich.
Männliche $\beta_2m^{-/-}$ bzw. C57BL/6 WT Mäuse wurden subkutan mit *O. tsutsugamushi* infiziert. **(A)** Die Überlebenskurven von $\beta_2m^{-/-}$ und WT Mäusen unterschieden sich signifikant. (Mantel-Cox Test). **(B)** Die Erregerlast im peripheren Blut der überlebenden Tiere wurde an Tag 16 p.i. und an Tag 21 p.i. mittels qPCR gemessen. Die Erregerlasten von $\beta_2m^{-/-}$ und WT Mäusen unterschieden sich signifikant an Tag 16 p.i. (*unpaired, two-tailed* t-Test). An Tag 21 p.i. konnten lediglich von drei $\beta_2m^{-/-}$ Mäusen Blutproben gewonnen werden, daher wurde kein Test auf statistische Signifikanz durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD zusammengefasster Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=7). n.d.: nicht durchgeführt; ***: p<0,001.

Sowohl die Depletion von $CD8^+$ T-Zellen als auch die Infektion von $\beta_2m^{-/-}$ Mäusen führte zu erhöhter Bakterienlast im peripheren Blut und vermindertem Überleben (nach $CD8^+$ T-Zell Depletion lediglich tendenziell) gegenüber den Kontrollen. Dies deutet auf eine zentrale Bedeutung von $CD8^+$ T-Zellen in der Kontrolle einer *O. tsutsugamushi* Infektion hin.

4.2.3 $CD8^+$ T-Zell Epitope

Nachdem im vorherigen Abschnitt eine zentrale Rolle von CD8+ T-Zellen bei der Kontrolle der O. tsutsugamushi Infektion gezeigt werden konnte, stellte sich nun die Frage, welche Epitope von *O. tsutsugamushi* von $CD8^+$ T-Zellen erkannt werden.

Dominante $CD8^+$ T-Zell Epitope bei *O. tsutsugamushi* sind bisher nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Suche auf zwei *O. tsutsugamushi* Oberflächenproteine beschränkt, welche zum einen stark exprimiert werden und zum anderen eine starke Antikörperantwort hervorrufen. Antikörper im Serum infizierter BALB/c Mäuse binden die gleichen Proteinban-

den wie ein monoklonaler Antikörper gegen das 56 kDa Protein und zusätzlich ein schwach exprimiertes Protein bei ca. 110-120 kDa sowie ein abundantes Protein bei ca. 50 kDa. Die 50 kDa Bande entspricht wahrscheinlich dem 47 kDa Protein, das im hier verwendeten *O. tsutsugamushi* Karp Stamm etwa bei dieser Größe in einer SDS-PAGE wandert [148] (Abb. 4.2.5 A). Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit das 47 kDa und das 56 kDa Protein auf das Vorhandensein von $CD8^+$ T-Zell Epitopen getestet. Die Proteine sollten intrazellulär in murinen Makrophagen exprimiert werden um eine Präsentation von Peptiden auf MHC-I Molekülen zu ermöglichen. Anschließend sollte überprüft werden, ob diese Zellen $CD8^+$ T-Zellen aus *O. tsutsugamushi* infizierten Mäusen stimulieren können. Dazu wurden die lentiviralen Vektoren (LeGO-Vektoren [142]) iC2-47 und iC2-56 (Dr. Anke Osterloh, Stefanie Papp, BNI, Hamburg) verwendet, welche für Fusionsproteine aus dem 47 kDa bzw. dem 56 kDa Protein mit den etablierten T-Zell Epitopen $Ova_{257-264}$ (SIINFEKL, H-$2K^b$) und $Ova_{323-339}$ (H2-IA^b / H2-IA^d) codieren (Abb. 4.2.5 B).

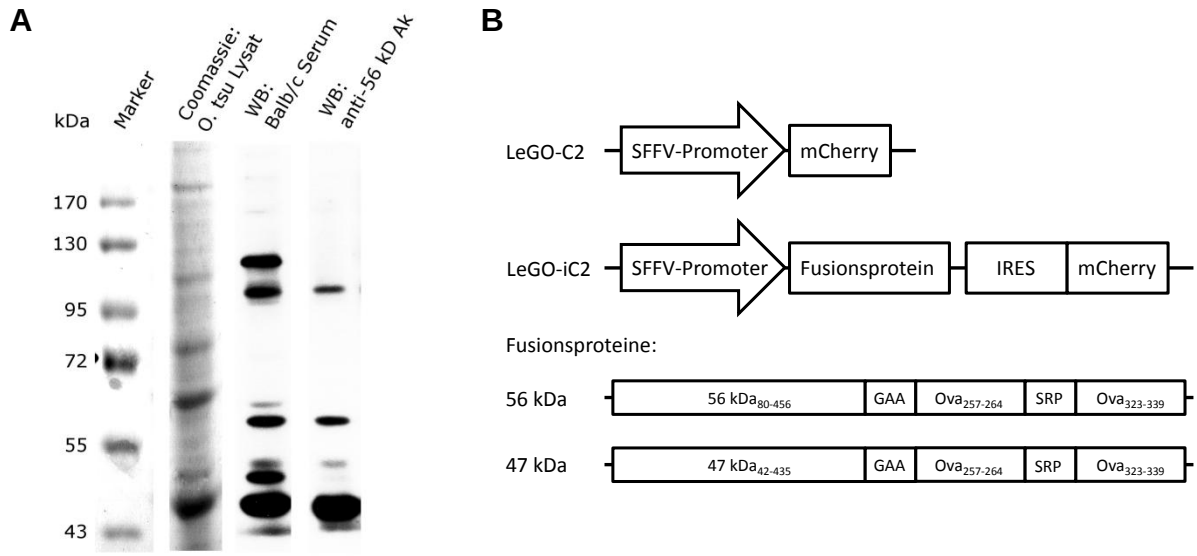


Abb. 4.2.5: Auswahl und Klonierung von Proteinen für die Suche nach $CD8^+$ T-Zell Epitopen.
(A) Mit *O. tsutsugamushi* infizierte Vero-Zellen wurden mechanisch aufgeschlossen und die Erreger über eine differentielle Zentrifugation aufgereinigt. Die Bakterien wurden in Lämmli-Puffer bei 95 °C aufgeschlossen und die Lösung anschließend in mehreren Taschen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Eine Linie des Gels wurde mit Coomassie gefärbt, von zwei Linien wurden Westernblots mit Serum einer infizierten BALB/c Maus bzw. mit einem monoklonalen Antikörper gegen das *O. tsutsugamushi* 56 kDa Protein angefertigt. **(B)** Die codierenden DNA-Sequenzen der *O. tsutsugamushi* 47 kDa und 56 kDa Proteine wurden als Fusionskonstrukte mit den Ovalbumin-Epitopen $Ova_{257-269}$ und $Ova_{323-339}$ in LeGO-iC2 Plasmide kloniert (weitere Informationen im Text). SFFV: *spleen focus forming virus;* IRES: *internal ribosomal entry site*; Ova: Ovalbumin des Huhns; GAA, SRP: Linker-Peptidsequenzen; WB: Westernblot; Ak: Antikörper.

Um eine intrazelluläre Expression zu gewährleisten, wurden trunkierte Sequenzen des 47 kDa Proteins [149] bzw. des 56 kDa Proteins [150, 151] kloniert, die keine Signalsequenzen zur

Membraninsertion enthielten. Neben den 47 kDa- bzw. 56 kDa-Antigenen codieren die Vektoren für das mCherry-Protein, dessen Expression über eine *IRES*-Sequenz an die der Antigene gekoppelt ist. Als Kontrolle diente das Plasmid LeGO-C2 (Abb. 4.2.5 B), das lediglich zur Expression von mCherry führt. Die Vektoren wurden für die Herstellung lentiviraler Partikel verwendet („Methoden“, Abschnitt 3.2.4).

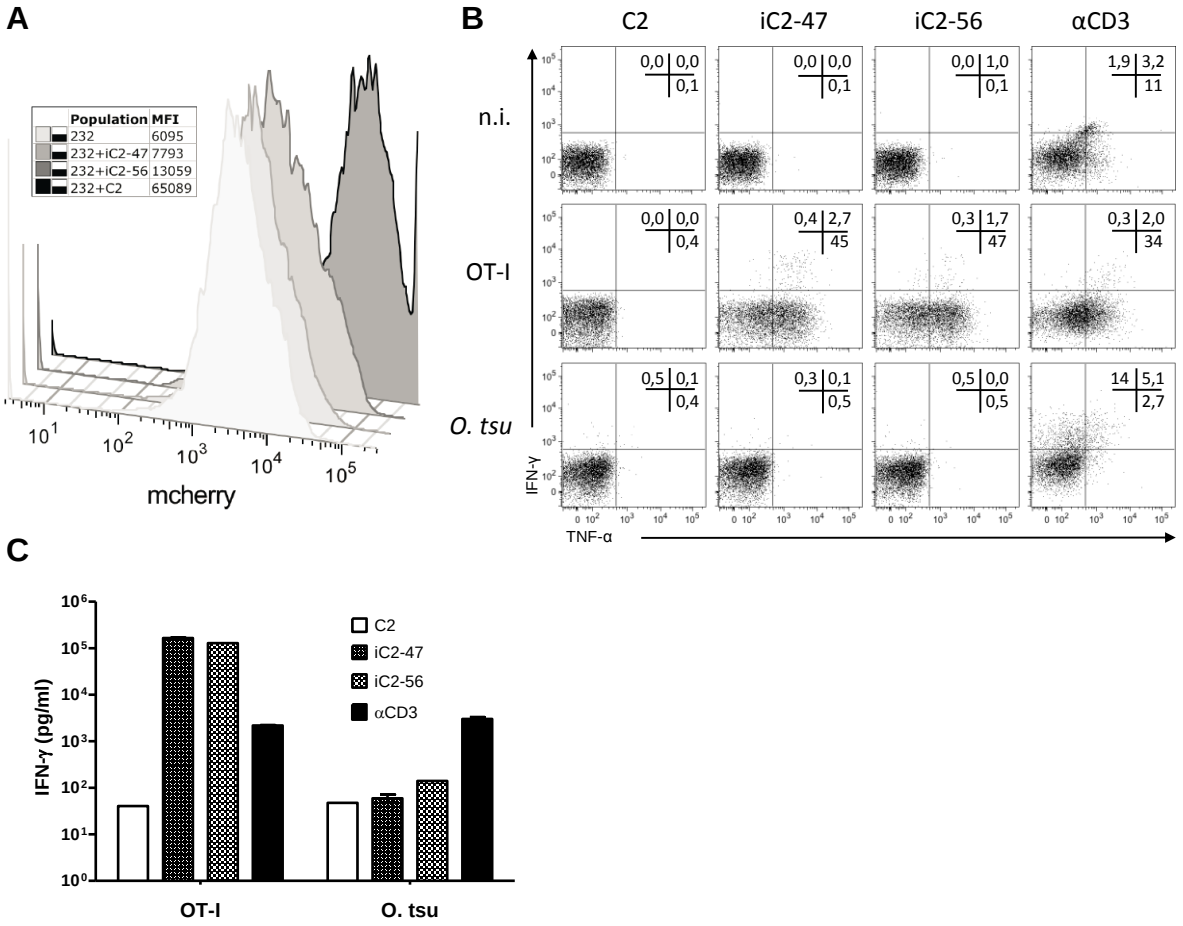


Abb. 4.2.6: Untersuchung der 47 kDa und 56 kDa-Proteine auf Anwesenheit von CD8$^+$ T-Zell Epitopen.
232-Makrophagen wurden mit LEGO-Vektoren transduziert. Die Vektoren enthielten kein *insert* (C2), bzw. trunkierte und um $OVA_{257-264}$ erweiterte Nukleotidsequenzen des 47 kDa Proteins (iC2-47) oder des 56 kDa Proteins (iC2-56) aus *O. tsutsugamushi*. **(A)** Die mCherry-Expression der transduzierten 232-Makrophagen sowie nicht-transduzierter Kontrollen wurde durchflusszytometrisch gemessen. **(B)** Splenozyten von einer nicht infizierten C57BL/6 Maus, einer OT-I Maus und einer C57BL/6 Maus 16 Tage nach subkutaner Infektion mit *O. tsutsugamushi* wurden in Anwesenheit von Monensin 6 h mit C2-, iC2-47- bzw. iC2-56-transduzierten 232-Makrophagen oder mit αCD3 Antikörper stimuliert. Die Zellen wurden anschließend extrazellulär mit den Antikörperkonjugaten CD8-eFluor450 und CD4-V500 sowie intrazellulär mit IFN-γ-FITC und TNF-α-APC gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Dotplots zeigen die Zytokinproduktion von CD4$^-$CD8$^+$ Zellen sowie die prozentualen Anteile von IFN-γ$^+$, TNF-α$^+$ und doppelt positiven Zellen. **(C)** Splenozyten der OT-I Maus und der C57BL/6 Maus 16 Tage nach subkutaner Infektion mit *O. tsutsugamushi* wurden vier Tage mit C2-, iC2-47- bzw. iC2-56-transduzierten 232-Makrophagen oder mit αCD3 Antikörper stimuliert. Die IFN-γ Konzentration in den Überständen wurde anschließend mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus zwei ELISA-Messwerten. MFI: *mean fluorescence intensity*; n.i.: nicht infiziert.

H-2K^b restringierte 232-Makrophagen wurden mit den lentiviralen Partikel transduziert. Die erfolgreiche Transkription der mRNA konnte durch die Expression von mCherry kontrolliert werden. Eine gegenüber nicht-transduzierten Makrophagen deutlich gesteigerte mCherry-Expression wurde in den Makrophagen gemessen, die mit C2-Kontrollvektor oder mit iC2-56 transduziert worden waren. 232-Makrophagen, welche mit iC2-47 transduziert worden waren zeigten lediglich eine minimal gesteigerte MFI (Abb. 4.2.6 A).

Splenozyten von nicht infizierten C57BL/6 Mäusen, OT-I Mäusen und *O. tsutsugamushi* infizierten C57BL/6 Mäusen wurden mit den transduzierten Makrophagen bzw. mit anti-CD3 Antikörper stimuliert und die Produktion von IFN-γ und TNF-α mittels intrazellulärer FACS-Färbung bestimmt. Die FACS-Plots zeigten, dass Splenozyten aus OT-I Mäusen nach Stimulation mit den iC2-47 und iC2-56-transduzierten Makrophagen zu einem größeren Anteil IFN-γ und zu einem deutlich größeren Anteil TNF-α produzierten, als nach Stimulation mit C2-transduzierte Makrophagen (Abb. 4.2.6 B). Damit wurde gezeigt, dass sowohl das 47 kDa als auch das 56 kDa Protein als Fusionsproteine mit den Ova-Epitopen exprimiert wurden.

Splenozyten aus nicht infizierten Mäusen reagierten auf anti-CD3 Stimulation hauptsächlich mit TNF-α und nur schwach mit IFN-γ Produktion. Splenozyten aus Mäusen, die 16 Tage zuvor subkutan mit *O. tsutsugamushi* infiziert worden waren, reagierten dagegen hauptsächlich mit einer erhöhten IFN-γ Produktion (Abb. 4.2.6 B). Splenozyten, die für sechs Stunden mit iC2-47- oder iC2-56-transduzierten Makrophagen stimuliert wurden, zeigten jedoch weder eine vermehrte IFN-γ noch eine vermehrte TNF-α Produktion. Splenozyten von OT-I Mäusen und *O. tsutsugamushi* infizierten C57BL/6 Mäusen wurden zusätzlich für vier Tage mit den transduzierten Makrophagen bzw. mit anti-CD3 Antikörper stimuliert und die Konzentration von IFN-γ in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Auch hierbei konnte nach Stimulation mit den iC2-47 oder iC2-56 transduzierten Makrophagen eine gesteigerte IFN-γ Produktion in Splenozyten aus den OT-I, aber nicht in Splenozyten aus den infizierten Mäusen beobachtet werden (Abb. 4.2.6 C).

Zusammenfassend geben die Ergebnisse keine Hinweise darauf, dass die *O. tsutsugamushi* 47 kDa und 56 kDa Proteine dominante H-2K^b-restringierten CD8$^+$ T-Zell Epitope enthalten.

4.3 Funktionelle Charakterisierung von Lymphozyten insbesondere hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass verschiedene Lymphozytenpopulationen während der Immunreaktion gegen *O. tsutsugamushi* expandieren und dass $CD8^+$ T-Zellen vor einem letalen Infektionsverlauf schützen. In diesem Abschnitt werden lymphozytentypische funktionelle Charakteristika der Immunantwort gegen *O. tsutsugamushi* dargestellt und die Bedeutung von IFN-γ näher analysiert.

4.3.1 Proliferationspotenzial von Lymphozyten

Das Proliferationspotenzial von *ex vivo* isolierten Zellen ist ein Maß für die Anzahl und die Reaktionsfähigkeit der durch den Erreger vorstimulierten T-Zellen.

Das Proliferationspotenzial von Zellen aus der Milz, der Lunge sowie den poplitealen und den mediastinalen Lymphknoten von *O. tsutsugamushi* infizierten Mäusen bzw. L929-Kontrollmäusen wurde im Zeitverlauf der Infektion (Milz und Lunge) bzw. an Tag 14 p.i. (Lymphknoten) untersucht. Die Zellsuspensionen wurden über drei Tage mit anti-CD3 oder *O. tsutsugamushi* Antigen restimuliert bzw. als Kontrolle ohne Stimulanzien inkubiert. Es zeigte sich, dass die Zellen aus Milz und Lunge infizierter Mäuse signifikant und aus dem poplitealen und den mediastinalen Lymphknoten tendenziell nach *ex vivo* anti-CD3 Stimulation weniger proliferierten, als Zellen aus nicht infizierten oder L929 behandelten Mäusen. Nach antigenspezifischer Restimulation proliferierten Zellen der Milz bzw. der poplitealen oder mediastinalen Lymphknoten infizierter Mäuse genauso stark wie entsprechende Zellen L929 behandelter Mäuse. In der Lunge war das Proliferationspotenzial der Zellen infizierter Mäuse aber auch nach antigenspezifischer Restimulation gegenüber den L929-Kontrollen verringert (Abb. 4.3.1).

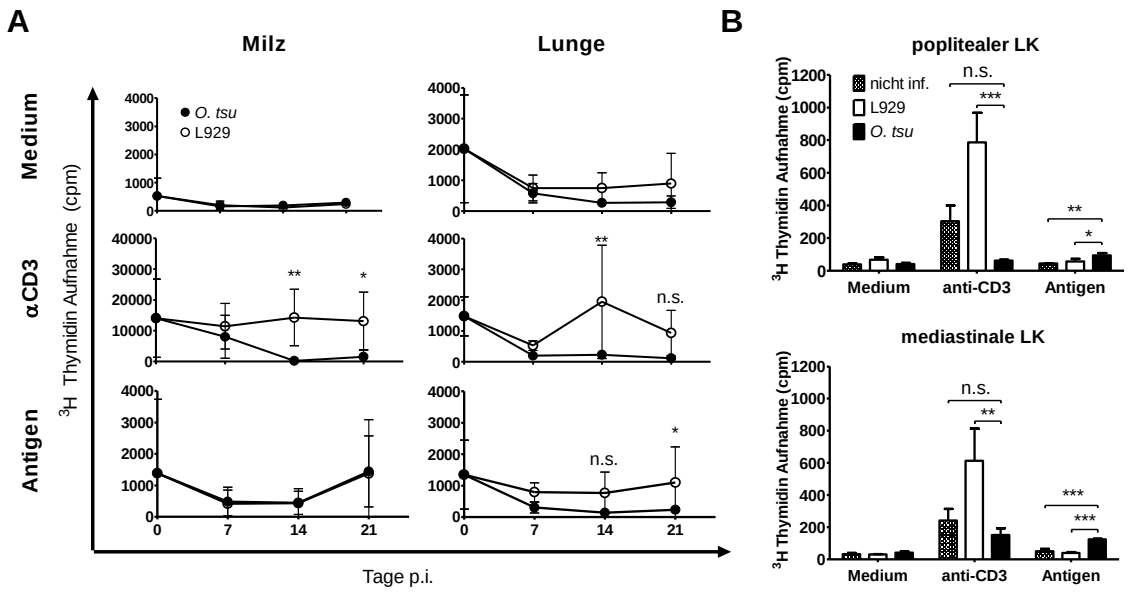


Abb. 4.3.1: Proliferation von *ex vivo* stimulierten Zellen aus *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Mäusen. Zellen aus der Milz und der Lunge von infizierten BALB/c Mäusen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert **(A)**. Zellen aus dem poplitealen (rechter Hinterlauf) und den mediastinalen Lymphknoten von infizierten Mäusen an Tag 14 p.i. (*O. tsu*), sowie Zellen von je drei nicht infizierten (nicht inf.) oder L929 behandelten (L929) Mäusen an Tag 14 p.i. wurden isoliert und ggf. vereint **(B)**. Die Zellen wurden über drei Tage mit anti-CD3 (αCD3) oder *O. tsutsugamushi* Antigen (Antigen) stimuliert oder ohne Stimulans kultiviert (Mediumkontrolle). Anschließend wurden die Zellen für 15-18 Stunden in Anwesenheit von ^{3}H-Thymidin weiter kultiviert und die Aktivität des eingebauten ^{3}H im Szintillationszähler gemessen. **(A)** Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD zusammengefasster Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=6). Die Messwerte der unbehandelten Mäuse (Tag 0) gelten sowohl für die Gruppe der infizierten, als auch für die Gruppe der L929 behandelten Mäuse. Die Berechnung statistisch relevanter Unterschiede erfolgte, für jede Stimulationsbedingung separat, mittels *two-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test* unter Ausschluss von Tag 0. **(B)** Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus einem von zwei repräsentativen Experimenten (n=3). Die Berechnung statistisch relevanter Unterschiede erfolgte, für jede Stimulationsbedingung separat, mittels *one-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test.* LK: Lymphknoten; cpm: *counts per minute*; n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

4.3.2 Regulation von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen in der Lunge

Im Zuge der Aktivierung von T-Zellen werden verschiedene Oberflächenmoleküle reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Expression des Aktivierungsmarkers CD62L (L-Selektin) und der T-Zell Rezeptor assoziierten Moleküle CD3 und CD8 auf T-Zellen der Lunge im Verlauf einer *O. tsutsugamushi* Infektion durchflusszytometrisch analysiert.

Der Anteil aktivierter ($CD62L^-$) $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen stieg kontinuierlich im zeitlichen Verlauf der Infektion, und 21 Tage p.i. zeigten über 80 % der $CD4^+$ bzw. über 90 % der $CD8^+$ T-Zellen einen aktivierten Phänotyp (Abb. 4.3.2 A). Im gleichen Zeitraum fiel die Expression von CD3 und CD8 auf $CD8^+$ T-Zellen ab (Abb. 4.3.2 B).

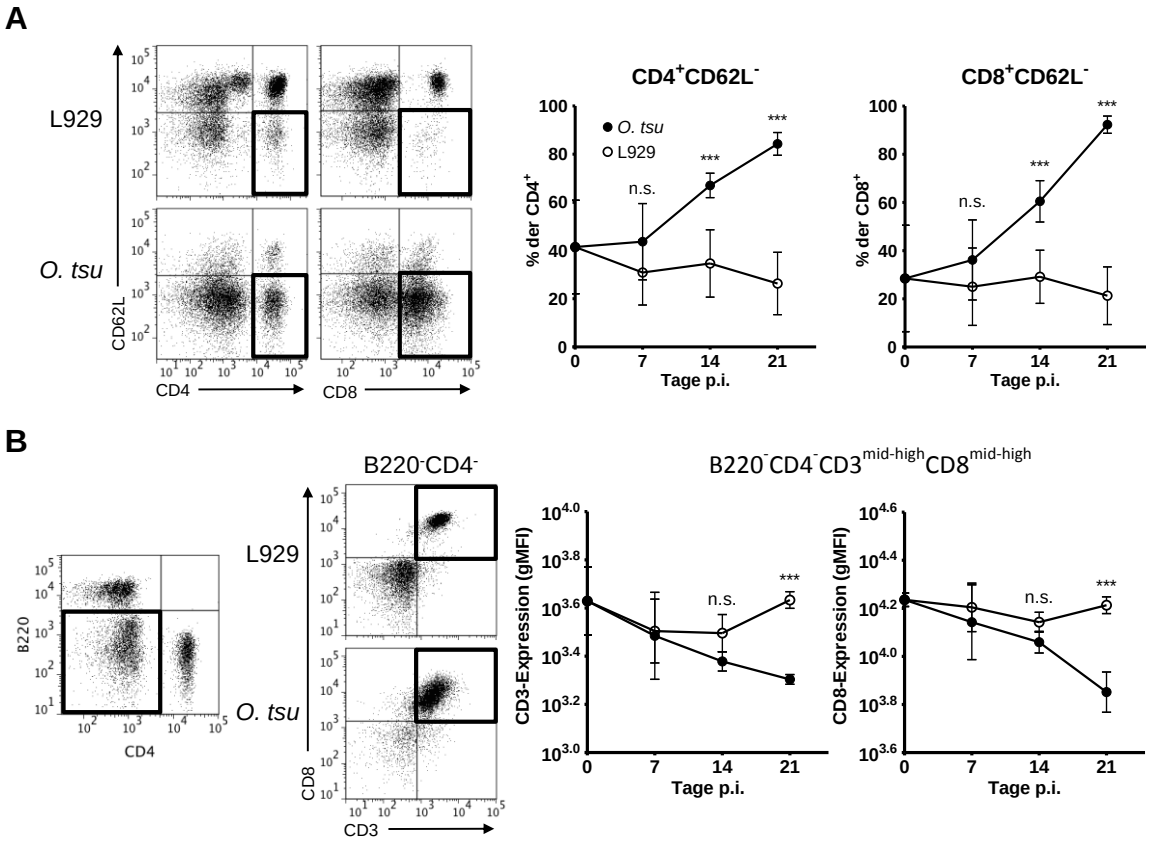


Abb. 4.3.2: Regulation von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen in der Lunge von *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Mäusen

Zellen aus den Lungen unbehandelter (Tag 0) sowie infizierter (*O. tsu*) und L929 behandelter (L929) BALB/c Mäuse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. **(A)** Zellen wurden mit den Antikörperkonjugaten CD62L-FITC, CD8-PerCP/Cy5.5 sowie CD4-APC gefärbt. Der Anteil aktivierter ($CD62L^-$) $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Dotplots zeigen exemplarisch die CD62L-Expression von $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ Lymphozyten einer L929 behandelten und einer infizierten Maus 21 Tage p.i. Die Graphen zeigen den Anteil aktivierter T-Zellen im Zeitverlauf. **(B)** Zellen wurden mit den Antikörperkonjugaten CD4-FITC, CD3-PE, CD8-PerCP/Cy5.5 und B220-APC gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Dotplots zeigen exemplarisch das *Gating* von $B220^-CD4^-$ Lymphozyten bzw. die CD3/CD8-Expression von $B220^-CD4^-$ Lymphozyten einer L929 behandelten und einer infizierten Maus 21 Tage p.i. Die Graphen zeigen die geometrisch-mittlere Fluoreszenzintensität von $B220^-CD4^-CD3^{mid\text{-}high}CD8^{mid\text{-}high}$ Lymphozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD zusammengefasster Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=6). Die Messwerte der unbehandelten Mäuse (Tag 0) gelten sowohl für die Gruppe der infizierten, als auch für die Gruppe der L929 behandelten Mäuse. Die Berechnung statistisch relevanter Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test* unter Ausschluss von Tag 0. gMFI: *geometric mean fluorescence intensity*; n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

4.3.3 Expression von Zytokinen

Zytokine sind interzelluläre Botenstoffe die für die Regulation einer Immunantwort und ihrer Effektorfunktionen entscheidend sind. Anhand des Zytokinprofils *ex vivo* isolierter und restimulierter Zellen kann der Funktionsmodus einer T-Zell Antwort gezeigt werden.

Die Expression von IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-10 und IL-17 in Zellen aus der Milz, der Lunge sowie dem poplitealen und den mediastinalen Lymphknoten wurde im Zeitverlauf der Infektion (Milz und Lunge) bzw. an Tag 14 p.i. (Lymphknoten) mittels ELISA quantifiziert. Die Zellsuspensionen wurden dazu über drei Tage mit *O. tsutsugamushi* Antigen oder mit einem anti-CD3 mAk restimuliert bzw. ohne Stimulanzien inkubiert. Das verwendete Antigen besteht aus aufgereinigten und hitzeinaktivierten Erregern. Die antigenspezifische Stimulation kann daher bei $CD4^+$ T-Zellen über MHC-II Peptidkomplexe, bei CD8+ T-Zellen über MHC-I Peptidkomplexe nach Kreuzpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen, bei B-Zellen über native Molekülstrukturen, oder bei Zellen des angeborenen Immunsystems über pathogen-assoziierte konservierte Moleküle (*PAMP*s) erfolgen. Bei der Restimulation mit anti-CD3 werden $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen stimuliert.

Nach Stimulation mit anti-CD3 konnte bei Zellen aus allen untersuchten Organen eine signifikant gesteigerte IFN-γ Expression gegenüber den L929 Kontrollen gezeigt werden (Abb. 4.3.3). Die Expression von TNF-α war bei Zellen der Lunge und der mediastinalen Lymphknoten signifikant gesteigert, bei Splenozyten fiel die Steigerung schwächer aus und im poplitealen Lymphknoten war keine gesteigerte TNF-α Expression erkennbar. Die IL-2 Expression war bei Zellen aus allen untersuchten Organen wenigstens tendenziell niedriger als bei den L929 Kontrollen. Die Expression von IL-4 und IL-10 war während der Spätphase der akuten Infektion bei Splenozyten signifikant schwächer als bei Zellen der L929 Kontrollen, aber gegenüber Tag 0 lediglich moderat (IL-4) bzw. nicht (IL-10) abgeschwächt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Reduktion Ausdruck der verminderten Proliferation anti-CD3 stimulierter Milzzellen ist (Abb. 4.3.1). Die IL-4 und IL-10 Expression bei Zellen des poplitealen Lymphknotens sowie der Lunge und der mediastinalen Lymphknoten war auf Hintergrundniveau. Die Expression von IL-17 war zu allen Zeitpunkten und bei Zellen aller untersuchter Organe auf Hintergrundniveau (Daten nicht abgebildet).

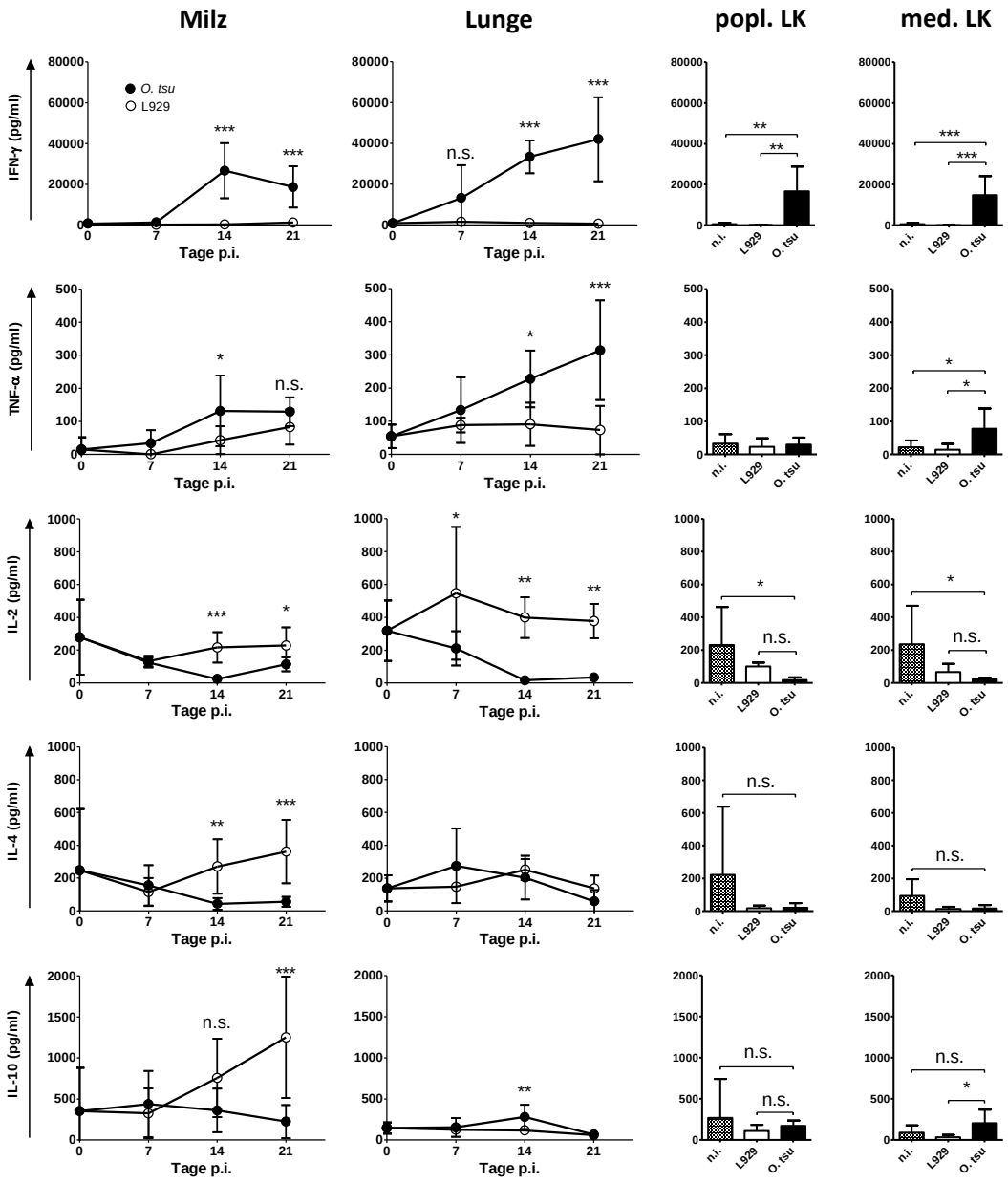


Abb. 4.3.3: Messung der Zytokinproduktion von Lymphozyten aus *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Mäusen nach Restimulation mit anti-CD3 mAk.

Zellen aus der Milz und der Lunge von infizierten BALB/c Mäusen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Zellen aus dem poplitealen (rechter Hinterlauf) und den mediastinalen Lymphknoten von infizierten Mäusen an Tag 14 p.i. (*O. tsu*), sowie Zellen von je drei nicht infizierten (n.i.) oder L929 behandelten (L929) Mäusen an Tag 14 p.i. wurden isoliert und ggf. vereint. Die Zellen wurden über drei Tage mit anti-CD3 (αCD3) stimuliert oder ohne Stimulans kultiviert (Mediumkontrolle). Anschließend wurden die Konzentrationen der Zytokine IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 und IL-10 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Die Zytokinkonzentrationen unstimulierter Zellen waren auf Hintergrundniveau (nicht abgebildet). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD zusammengefasster Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=6). Bei den Milz- und Lungenproben gelten die Messwerte der unbehandelten Mäuse (Tag 0) sowohl für die Gruppe der infizierten, als auch für die Gruppe der L929 behandelten Mäuse. Die Berechnung statistisch relevanter Unterschiede erfolgte für die Milz- und Lungenproben mittels *two-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test* unter Ausschluss von Tag 0 und für die Proben aus den Lymphknoten mittels *one-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test.* n.i.: nicht infiziert; popl. LK: poplitealer Lymphknoten; med. LK: mediastinale Lymphknoten; n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

Auch nach Stimulation mit *O. tsutsugamushi* Antigen wurde bei Zellen aus allen untersuchten Organen eine signifikant gesteigerte IFN-γ Expression gegenüber den nicht infizierten Kontrollen beobachtet (Abb. 4.3.4). Es konnte eine gesteigerte TNF-α Expression beobachtet werden, die jedoch nur bei Splenozyten 21 Tage p.i. und bei Zellen des poplitealen Lymphknotens signifikant höher als bei Zellen der L929 Kontrollen war. Im Gegensatz zur anti-CD3 Stimulation konnte nach Inkubation mit Antigen eine gegenüber den Kontrollen gesteigerte IL-10 Expression gezeigt werden. Die Expression von IL-2, IL-4 und IL-17 war nach Stimulation mit Antigen zu allen Zeitpunkten und bei Zellen aller untersuchter Organe und Gruppen auf Hintergrundniveau (Daten nicht abgebildet).

Zusammenfassend wurde in Zellen von mit *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Mäusen ein IFN-γ dominiertes Th1-typisches Zytokinmillieu mit Beteiligung von proinflammatorischem TNF-α und Suppression des Th2-Zytokins IL-4 gezeigt. Moderate Konzentrationen von immunsuppressivem IL-10 konnten nach antigenspezifischer Stimulation und dabei insbesondere in der Milz gemessen werden. Desweiteren wurde eine verminderte IL-2 Expression, sowie ein vermindertes Proliferationspotential (Abb. 4.3.1) festgestellt.

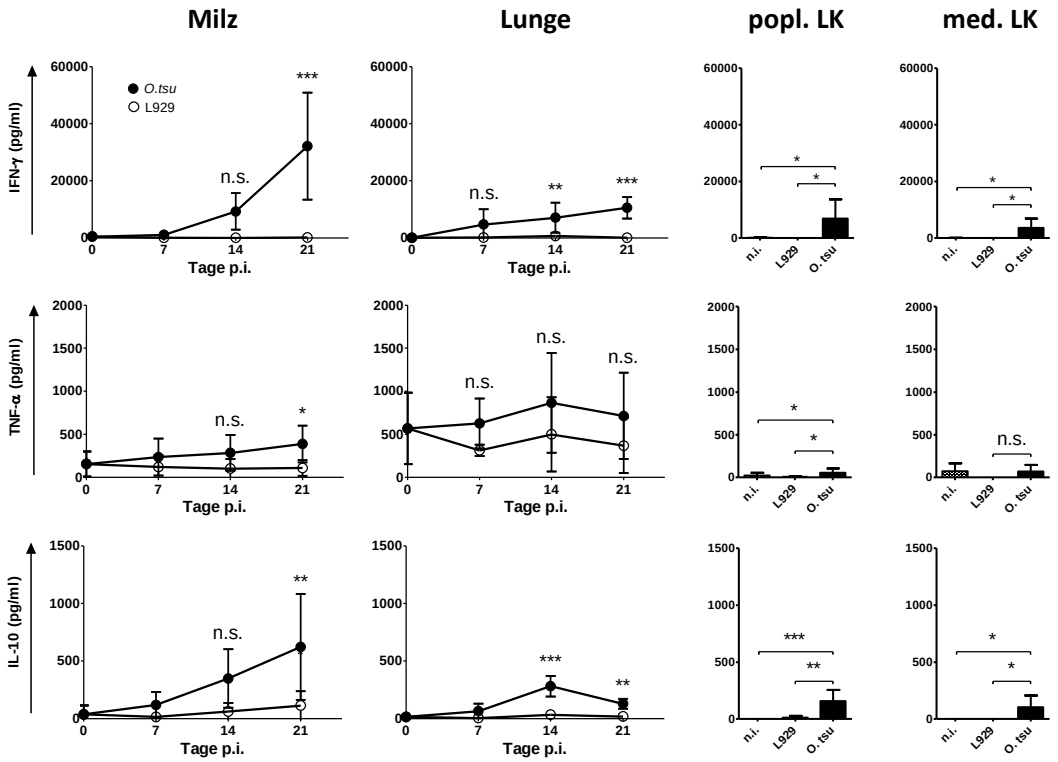


Abb. 4.3.4: Messung der Zytokinproduktion von Lymphozyten aus *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Mäusen nach Restimulation mit Antigen.

Zellen aus der Milz und der Lunge von infizierten BALB/c Mäusen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Zellen aus dem poplitealen (rechter Hinterlauf) und den mediastinalen Lymphknoten von infizierten Mäusen (*O. tsu*), sowie Zellen von je drei nicht infizierten (n.i.) oder L929 behandelten (L929) Mäusen an Tag 14 p.i. wurden isoliert und ggf. vereint. Die Zellen wurden über drei Tage mit *O. tsutsugamushi* Antigen (Antigen) stimuliert oder ohne Stimulans kultiviert (Mediumkontrolle). Anschließend wurden die Konzentrationen der Zytokine IFN-γ, TNF-α und IL-10 in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Die Zytokinkonzentrationen unstimulierter Zellen waren auf Hintergrundniveau (nicht abgebildet). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD zusammengefasster Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=6). Bei den Milz- und Lungenproben gelten die Messwerte der unbehandelten Mäuse (Tag 0) sowohl für die Gruppe der infizierten, als auch für die Gruppe der L929 behandelten Mäuse. Die Berechnung statistisch relevanter Unterschiede erfolgte für die Milz- und Lungenproben mittels *two-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test* unter Ausschluss von Tag 0 und für die Proben aus den Lymphknoten mittels *one-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test.* n.i.: nicht infiziert; popl. LK: poplitealer Lymphknoten; med. LK: mediastinale Lymphknoten; n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

Um die zelluläre Quelle der Zytokine IFN-γ und TNF-α zu bestimmen, wurden Milzzellen intrazellulär mit IFN-γ bzw. TNF-α spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.3.5 A).

Es zeigte sich, dass $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie $DX5^+$ NK-Zellen infizierter Tiere spätestens ab Tag 14 p.i. zu einem signifikant höheren Anteil IFN-γ produzierten als in L929-behandelten Tieren (Abb.4.3.5 B). Der Anteil IFN-γ^+ $CD4^+$ T-Zellen (10 % an Tag 21 p.i.) blieb jedoch deutlich hinter dem Anteil IFN-γ^+CD8^+ T-Zellen (25 %) und NK-Zellen (30 %)

zurück. Unter Berücksichtigung des CD4/CD8 Verhältnisses (Abb. 4.2.1), welches an Tag 21 p.i. in der Milz annähernd 1:1 war, kann auf eine hohe Bedeutung von $CD8^+$ T-Zellen für die Produktion von IFN-γ in der Milz geschlossen werden. Bedenkt man das CD4/CD8-Verhältnis in der Lunge (Abb. 4.2.2), welches an Tag 21 p.i. ca. 1:4 betrug, kann vermutet werden, dass auch hier $CD8^+$ T-Zellen eine große Bedeutung für die IFN-γ Produktion haben. In der frühen Phase der Infektion waren nur wenige $CD8^+$ T-Zellen vorhanden (Abb. 4.2.1. und 4.2.2), und eine signifikant gesteigerte IFN-γ Produktion nach Restimulation der T-Zellen mit anti-CD3 konnte erst ab Tag 14 p.i. gemessen werden (Abb. 4.3.3). Eine signifikant gesteigerte IFN-γ Produktion in NK-Zellen konnte dagegen schon an Tag 7 p.i. gemessen werden.

Der Anteil TNF-α exprimierender $CD4^+$ T-Zellen war in Splenozyten infizierter Tiere an Tag 14 p.i. signifikant und an Tag 21 p.i. tendenziell geringer als in Splenozyten L929-behandelter Tiere. Bei $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen wurden keine Unterschiede zwischen den Splenozyten aus Tieren der unterschiedlichen Gruppen gemessen (Abb. 4.3.5 B). In Abb. 4.3.3 und 4.3.4 wurde hingegen eine moderat, aber dennoch an Tag 14 p.i. bzw. an Tag 21 p.i. signifikant, gesteigerte TNF-α Konzentration in den Überständen restimulierter Splenozyten gezeigt. Die zelluläre Quelle von TNF-α könnten insbesondere Makrophagen sein, die über *PAMP*s (im Falle der Stimulation mit *O. tsutsugamushi* Antigen) bzw. durch *in situ* produziertes IFN-γ stimuliert wurden.

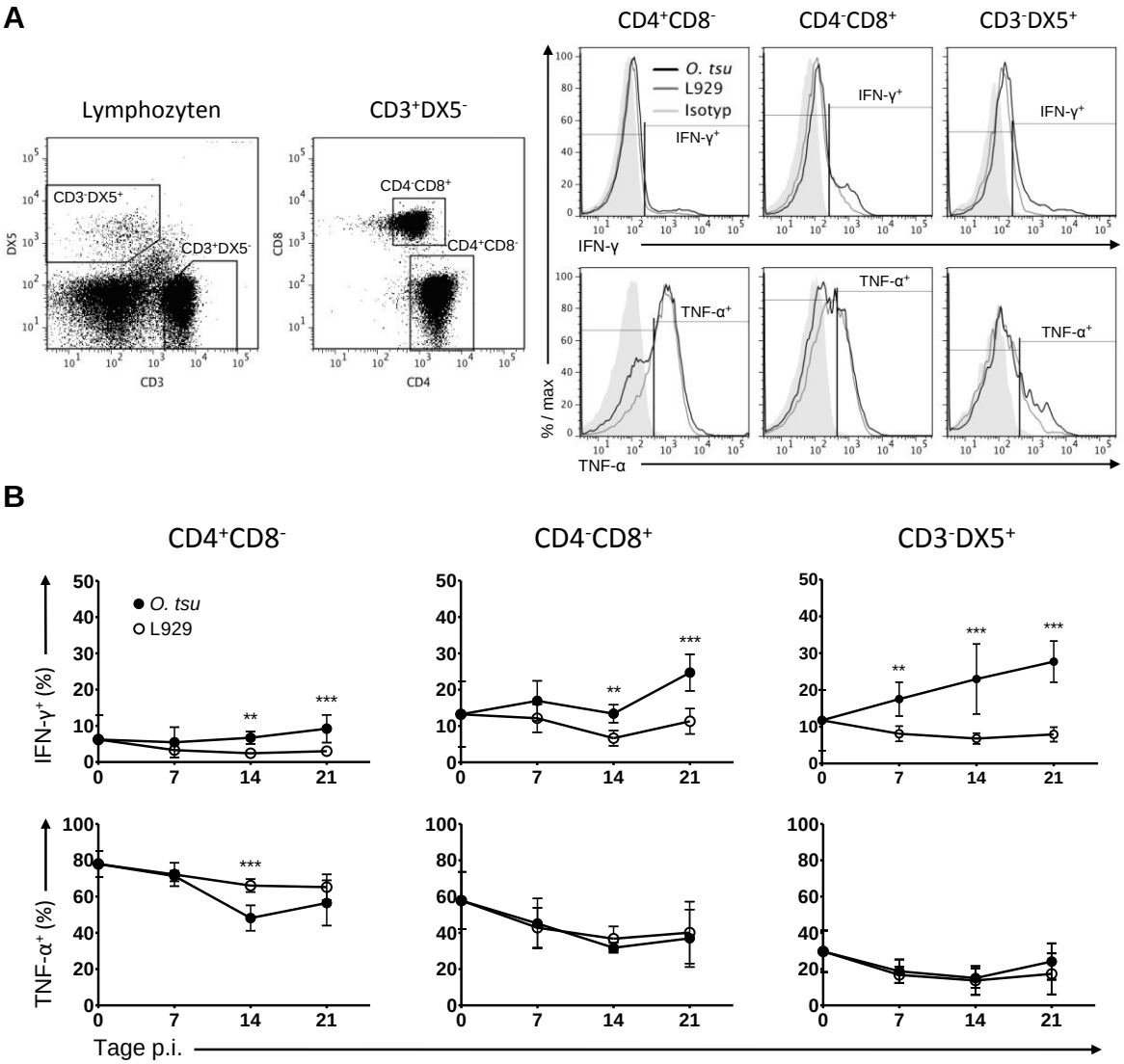


Abb. 4.3.5: Intrazelluläre IFN-γ und TNF-α Produktion in Lymphozyten aus *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Mäusen.

Splenozyten unbehandelter (Tag 0) sowie infizierter (*O. tsu*) und L929 behandelter (L929) BALB/c Mäuse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und 4 h in Anwesenheit von Monensin mit PMA/Ionomycin restimuliert. Die Zellen wurden extrazellulär mit den Antikörperkonjugaten CD8-eFluor450, CD4-V500, DX5-PE, CD3-PerCP/Cy5.5 sowie intrazellulär mit IFN-γ-FITC und TNF-α-APC oder den FITC- bzw. APC-konjugierten Isotypkontrollen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die *Gating*-Strategie ist in **(A)** exemplarisch dargestellt. Die Histogramme zeigen Splenozyten einer infizierten Maus 21 Tage p.i. (*O. tsu*, Isotyp) bzw. einer Maus 21 Tage nach Injektion von L929-Zellen. **(B)** Gezeigt sind die prozentualen Anteile IFN-γ bzw. TNF-α produzierender $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen bzw. $DX5^+$ NK-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD zusammengefasster Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=7). Die Messwerte der unbehandelten Mäuse (Tag 0) gelten sowohl für die Gruppe der infizierten, als auch für die Gruppe der L929 behandelten Mäuse. Die Berechnung statistisch relevanter Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test*, unter Ausschluss von Tag 0. n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

4.3.4 Die Bedeutung von IFN-γ für die Kontrolle der *O. tsutsugamushi* Infektion in BALB/c Mäusen

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass mit *O. tsutsugamushi* infizierte BALB/c Mäuse eine starke IFN-γ Antwort entwickelten während parallel die Erregerlast zurückging. Um zu untersuchen, ob IFN-γ *in vivo* einen protektiven Effekt hat wurde dieses im Laufe einer etablierten Infektion mit einem monoklonalen anti-IFN-γ Antikörper neutralisiert.

Es zeigte sich, dass Mäuse denen an Tag 14 p.i. anti-IFN-γ injiziert wurde an Tag 16 und 18 p.i. einen geringeren *Score* aufwiesen, als Mäuse denen Ratten-IgG injiziert wurde (Abb. 4.3.6 A). Demnach scheint IFN-γ in dieser Phase der Infektion mitverantwortlich für die Krankheitssymptome zu sein. An Tag 21 p.i. war der *Score* der IFN-γ behandelten Mäuse jedoch höher als der *Score* jener Mäuse, welche mit Ratten-IgG behandelt wurden (Abb. 4.3.5 B).

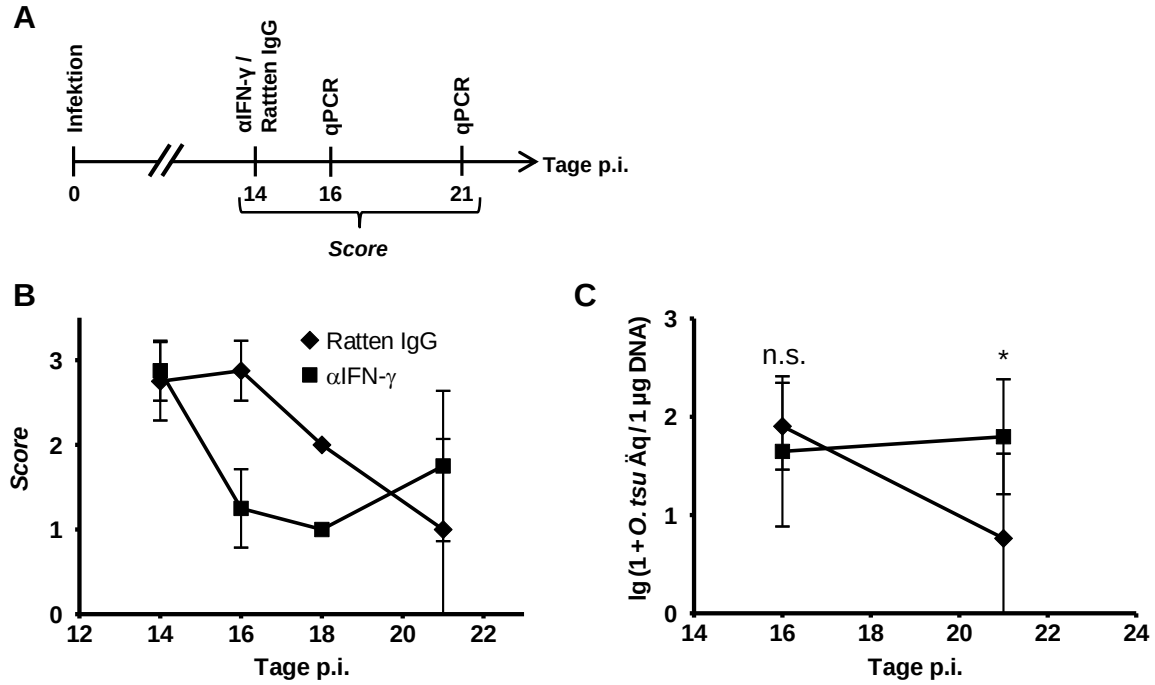


Abb. 4.3.6: Neutralisierung von IFN-γ während der O. tsutsugamushi Infektion von BALB/c Mäusen.
(A) Experimenteller Ablauf: BALB/c Mäuse wurden subkutan mit *O. tsutsugamushi* infiziert. An Tag 14 p.i. wurde den Tieren intraperitoneal anti-IFN-γ Antikörper oder Ratten-IgG injiziert. In den folgenden Tagen wurde der *Score* der Mäuse bestimmt **(B)** und an Tag 16 und 21 p.i. wurde die Erregerlast im Blut mittels qPCR bestimmt **(C)**. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD zusammengefasster Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=8). Die Berechnung statistisch relevanter Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test*. n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05.

Die Erregerlast im peripheren Blut der Mäuse war an Tag 16 p.i. in beiden Gruppen auf gleichem Niveau. An Tag 21 p.i. war die Erregerlast in den anti-IFN-γ behandelten Mäusen gegenüber Tag 16 p.i. leicht angestiegen, während in den Mäusen die mit Ratten-IgG behandelt wurden eine signifikant geringere Erregerlast im peripheren Blut gemessen wurde. Eine wichtige Funktion von IFN-γ ist die Aktivierung von Makrophagen zur gesteigerten Phagozytose sowie zum intrazellulären Abbau von Erregern.

Um zu untersuchen, ob durch IFN-γ aktivierte Makrophagen das Wachstum von *O. tsutsugamushi* limitieren können, wurden 232-Makrophagenkulturen mit *O. tsutsugamushi* infiziert und mit 10, 100 oder 1000 U rekombinantem IFN-γ oder mit Tetrazyklin (Positivkontrolle) behandelt. An Tag 3, 5, 7 p.i. wurden die Erreger in den Kulturen mittels qPCR quantifiziert. Die IFN-γ behandelten Makrophagen zeigten zu allen Zeitpunkten gegenüber unbehandelten Kulturen signifikant verringerte Erregerlasten, wobei die Gabe von 100 U IFN-γ am effektivsten war (Abb. 4.3.7 A).

Zu den Effektormechanismen von Makrophagen gehören reaktive Stickstoffintermediate, die auf der Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (*iNOS*) basieren. Ein weiterer Mechanismus ist die Deprivation der Aminosäure Tryptophan, durch die Wirkung der Indolamindioxygenase (IDO). IDO katalysiert den Abbau von Indolamin, einem Edukt für die Tryptophansynthese, zu Kynurenin. Intrazelluläre Erreger können außerdem durch Autophagozytose abgebaut werden. Die genannten zellulären Mechanismen können durch verschiedene Substanzen inhibiert werden. N-Monomethylarginin (NMMA) ist ein Inhibitor von *iNOS*, 1-Methyltryptophan (1-MT) inhibiert die *IDO*, und Wortmannin ist ein Autophagie-Inhibitor. Um zu untersuchen welche Effektormechanismen der Makrophagen für die, durch IFN-γ stimulierbare Bekämpfung von *O. tsutsugamushi* verantwortlich sind, wurden erneut 232-Makrophagen infiziert und mit 100 U rekombinantem IFN-γ oder mit Tetrazyklin behandelt. Zusätzlich wurden den IFN-γ behandelten Kulturen anti-IFN-γ, NMMA, 1-MT oder Wortmannin zugesetzt. Nach drei Tagen wurde die Erregerlast in den Kulturen mittels qPCR gemessen.

Wie schon in Abb. 4.3.7 A gezeigt bewirkte IFN-γ wieder eine signifikante Verringerung der Erregerlast. Eine zusätzliche Gabe von anti-IFN-γ hob diesen Effekt vollständig auf, wodurch gezeigt wurde, dass die verwendete IFN-γ Charge keinen unspezifischen Effekt durch unerwünschte Bestandteile wie LPS auf die Erregerlast hatte. Allerdings zeigte IFN-γ eine signifikant schwächere Wirkung als das Antibiotikum Tetrazyklin. NMMA, aber nicht 1-MT oder Wortmannin, konnte die Wirkung von IFN-γ teilweise aufheben (Abb. 4.3.6 B).

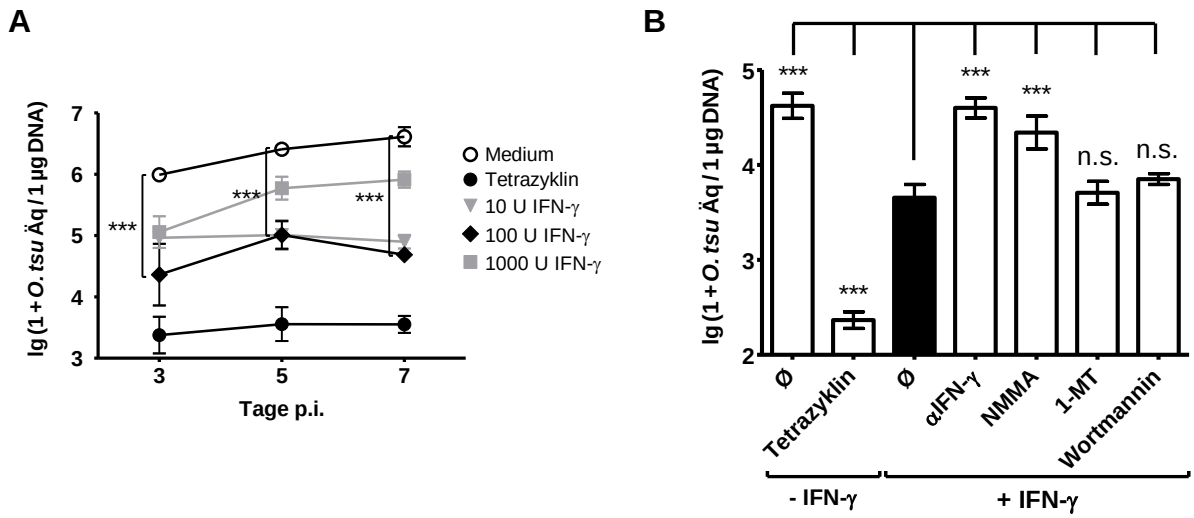


Abb. 4.3.7: Makrophagen inhibieren das Wachstum von *O. tsutsugmushi in vitro* nach Stimulation mit IFN-γ in einem iNOS-abhängigen Mechanismus.

(A) 232-Makrophagen wurden mit *O. tsutsugamushi* infiziert und mit Tetrazyklin bzw. mit 10, 100 oder 1000 U rekombinantem IFN-γ behandelt oder unbehandelt belassen (Medium). Die Erregerlast wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels qPCR gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD (n=4). Die Berechnung statistisch relevanter Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test.* **(B)** 232-Makrophagen wurden mit *O. tsutsugamushi* infiziert und ohne IFN-γ (-IFN-γ) sowie ohne (Ø) oder mit Tetrazyklin, oder mit IFN-γ (+IFN-γ) sowie ohne (Ø) oder mit anti-IFN-γ, NMMA, 1-MT oder Wortmannin kultiviert. Die Erregerlast wurde drei Tage p.i. mittels qPCR bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD aus einem von zwei repräsentativen Experimenten (n=4). Die Berechnung statistisch relevanter Unterschiede erfolgte mittels *one-way* ANOVA mit *Bonferroni's post test.* NMMA: N-Monomethylarginin; 1-MT: 1-Methyltryptophan; n.s.: nicht signifikant; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

Die Daten deuten darauf hin, dass durch IFN-γ stimulierte 232-Makrophagen das Wachstum von *O. tsutsugamushi* also wenigstens zum Teil durch einen *iNOS*-abhängigen Mechanismus reduzierten.

Kapitel 5: Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Akutphase einer *O. tsutsugamushi* Infektion im Modell einer subkutanen Infektion von Mäusen bezüglich der Erregerlast in Zielgeweben und histologischer Organveränderungen beschrieben. Die lymphozytäre Immunreaktion gegen den Erreger wurde deskriptiv und funktionell charakterisiert.

5.1 Infektionsmodell, Zielorgane und Zielzellen

Aus verschiedenen Infektionsmodellen und natürlichen Infektionen mit Rickettsien ist bekannt, dass die Erreger eine systemische Vaskulitis oder Perivaskulitis verursachen (*Review*: [152]). Eine systematische Suche nach den Zielgeweben von *O. tsutsugamushi* in der akuten Phase der Erkrankung wurde jedoch bisher nur immunhistologisch von Kundin *et al.* sowie von Murata *et al.* mit Techniken der 1960er bis 1980er Jahre vorgenommen. Nach subkutaner Infektion konnte Erregerantigen vor allem in Kupffer-Zellen der Leber, Endothelzellen der Milz und der Lymphknoten, sowie in mesothelialem Bindegewebe und in Entzündungszellen der Leber, Milz, Nieren und Lunge nachgewiesen werden [37, 38]. Eine Quantifizierung der Erregerlasten im zeitlichen Verlauf der Infektion und in diversen Organen wurde bisher nicht durchgeführt.

Vorversuche die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden zeigten, dass die Erregerlasten in Mausgeweben im Bereich des Detektionslimits von klassischen Einzelkopien-qPCRs liegen. Deshalb wurde eine hochsensitive qPCR entwickelt, die im *O. tsutsugamushi* Karp Stamm mehr als 20 Allele des *traD* Gens amplifiziert. Diese Möglichkeit ergab sich durch das extrem repetitive Genom von *O. tsutsugamushi*, welches diverse Gene in multiplen Allelen codiert [18]. Mit Hilfe dieser Technik wurde die Erregerlast ausgewählter Mausorgane im zeitlichen Verlauf der Infektion quantitativ analysiert. Es zeigte sich, dass der Erreger in der Frühphase der Infektion den drainierenden Lymphknoten befällt, sich danach aber systemisch ausbreitet. Nach zwei Wochen war die Erregerlast in den untersuchten Organen maximal, und

drei Wochen nach der Infektion waren nur noch geringe Konzentrationen von Erreger-DNA nachweisbar. In der Lunge konnte die höchste Erregerlast von allen untersuchten Geweben gezeigt werden.

Immunhistologische Färbungen der Lunge zwei Wochen nach der Infektion, also zum Zeitpunkt der höchsten Erregerlast, ermöglichten einen Nachweis von *O. tsutsugamushi* vor allem im Bereich der Pleura und vereinzelt im Parenchym. Erregerantigen war außerdem halbmondförmig um Hohlgefäße zu finden, bei denen es sich vermutlich um Bronchiolen handelte. Die Quelle könnten Erreger sein, die über peribronchiale Blutgefäße in die Lunge gelangt sind und dort von Immunzellen degradiert wurden. Nach drei Wochen zeigten sich histologisch Anzeichen einer chronischen Pneumonie mit betont perivaskulären Infiltraten. Die Infiltrate zeigten sich im Bereich kleiner sowie peribronchialer Blutgefäße und parenchymseitig an der Pleura. Sie folgten damit den Orten, an denen Erregerantigen nachgewiesen wurde. Dieses Bild ähnelt zudem Beobachtungen aus humanen Lungenbiopsien, die von Moron *et al.*, sowie von Park *et al.* gezeigt wurden [34, 153] und ist konsistent mit der beschriebenen pulmonalen Pathologie die bei Menschen in den meisten Fällen einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* auftritt [42, 153, 154].

Der vergleichbare zeitliche Verlauf der Erkrankung mit Symptomen zwischen der zweiten und dritten Woche nach der Infektion, die Bedeutung der Lunge als zentrales Zielorgan der Infektion, sowie die Vergleichbarkeit der Lungenpathologie sind wichtige Kriterien, die die Relevanz des Mausmodells für die humane Infektion demonstrieren. Zudem wurde von anderen Gruppen bereits eine Erregerpersistenz nach der Akutphase einer murinen *O. tsutsugamushi* Infektion beschrieben [9, 10, 37, 62], wie sie auch aus humanen Infektionen bekannt ist [7, 8].

Ein Lungentropismus wurde auch für *Rickettsia prowazekii* [155] und *Rickettsia typhi* [156] nach intravenöser Infektion beschrieben. Interstitielle Pneumonien nach Infektion mit *Rickettsia rickettsii* deuten ebenso auf einen Lungentropsimus hin [157]. Der Lungentropismus von Rickettsien könnte durch die große Verfügbarkeit der endothelialen Wirtszellen erklärt werden, die im ausgedehnten Kapillarbett der Lunge zu finden sind. Ob Endothelzellen wichtige Zielzellen einer *O. tsutsugamushi* Infektion sind, ist jedoch umstritten. Die Ausbreitung von *O. tsutsugamushi* erfolgt wahrscheinlich über das Blutgefäßsystem, zellgebunden in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*PBMC*s) [158]. Ähnlich wie bei der Metastasierung von Tumoren ist es daher denkbar, dass infizierte Zellen nach Verlassen der drainierenden Lymphknotens über die Lymphe oder über das Blutgefäßsystem zuerst in der Lunge ein

Kapillarbett vorfinden, in dem sie zurückgehalten werden [159]. Hier könnten die infizierten Zellen durch Extravasation in das Lungengewebe übertreten, oder die Erreger direkt Endothelzellen infizieren. Diese Hypothese wirft jedoch die Frage auf warum andere intrazelluläre Erreger, wie *L. monocytogenes* hauptsächlich die Leber befallen. In diesem Modell könnte jedoch die Affinität der Listerien zu Hepatozyten entscheidend sein, oder, dass *O. tsutsugamushi* an der Infektionsstelle oder im regionalen Lymphknoten von Wirtszellen aufgenommen wird und sich anschließend zellgebunden im Blutgefäßsystem bewegt [31, 158]. Listerien dagegen können sich wahrscheinlich länger zellfrei im Blutgefäßsystem ausbreiten und Wirtszellen direkt im Zielgewebe penetrieren [160, 161]. Ob der Lungentropismus von *O. tsutsugamushi* jedoch allein mechanisch bedingt ist, oder ob eine Regulation von spezifischen Adhäsionsmolekülen (z.B. Integrinen) oder von Chemokinen bzw. Chemokinrezeptoren eine Rolle spielt, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht geklärt werden.

Die Wirtszellen von *O. tsutsugamushi* sind bisher unzureichend aufgeklärt. In Autopsie-Fällen konnte *O. tsutsugamushi* in Makrophagen, Kupffer-Zellen sowie in Herzmuskelzellen und Endothelzellen gezeigt werden [33, 34]. In immunhistologischen Untersuchungen von Escharen *O. tsutsugamushi* infizierter Patienten in der akuten Krankheitsphase konnten Erreger vor allem in Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen nachgewiesen werden, Endothelzellen waren jedoch selten betroffen [31]. In murinen *O. tsutsugamushi*-Infektionen wurden lediglich in einer Studie von Murata *et al.* systematisch die Zielzellen nach subkutaner Infektion mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dabei wurden infizierte Kupffer-Zellen sowie infizierte Endothelzellen der Leber und der Milz von suszeptiblen BALB/c (nu/nu) gezeigt [38]. Nach intraperitonealer Infektion wurden vor allem infizierte Mesothelzellen sowie Entzündungszellen in Bereich der Kapseln von Leber, Milz und Nieren gefunden [38]. Immunhistologische Studien mit dem Ziel Wirtszellen zu identifizieren erfordern Antikörper, welche die Erreger zuverlässig im Gewebe binden können. Das 56 kDa Oberflächenantigen von *O. tsutsugamushi* wurde häufig für den Nachweis von *O. tsutsugamushi* benutzt. Während dieses Protein in der Summe in einer Zellkultur abundant exprimiert wird, deuten Vorversuche die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden jedoch auf eine schwache Expression in Zellen hin, die mit wenigen Erregern infiziert sind. Eine differenzielle Regulation auch von anderen Oberflächenmolekülen kann nicht ausgeschlossen werden. Ebenso ist ungewiss, ob die Regulation nur in bestimmten Wirtszellen stattfindet. In dem Fall könnte die Infektion in solchen Zellen mit immunhistologischen Methoden übersehen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden potentielle Zielzellen durchflusszytometrisch sortiert und die Erreger-DNA in den sortierten Populationen anschließend mittels qPCR quantifiziert. Diese Methode ist unab-

hängig von der Expression erregerspezifischer Antigene, erlaubt eine gute Differenzierung verschiedener Zellpopulationen durch spezifische Antikörper und ist äußerst sensitiv. Mit Hilfe dieser Technik wurde Erreger-DNA in dendritischen Zellen, Monozyten, Granulozyten und Makrophagen aus der Lunge nachgewiesen. Der Nachweis erregerspezifischer DNA bedeutet allerdings nicht zwingend, dass die Zellen mit vitalen Erregern infiziert waren. Ebenso könnte es sich um DNA von phagozytierten und degradierten Erregern handeln. Obwohl in den hier vorgestellten Ergebnissen keine signifikanten Unterschiede zur gesamten Lungen-Zellsuspension festgestellt wurden, konnte die erfolgreiche Durchführung dieser Technik demonstriert werden. In folgenden Experimenten sollte, als Negativkontrolle eine Zellpopulation in die Versuche eingeschlossen werden, die vermutlich keine Erreger-DNA enthält. Dies könnten z.B. T-Zellen sein [31].

5.2 Lymphozytäre Immunreaktion

Im vorgestellten Infektionsmodell konnten gesteigerte B- und T-Zell Zahlen im drainierenden Lymphknoten und in der Milz gezeigt werden, wobei die Reaktion in der Milz erst zwei Wochen nach der Infektion einsetzte. Dieses Bild ist übereinstimmend mit der Beobachtung, dass der Erreger in der Frühphase im drainierenden Lymphknoten zu finden ist, sich später aber systemisch ausbreitet. Forschungen der 1970er bis 1990er Jahre zeigen, dass Antikörper lediglich einen teilweisen Schutz vermitteln können, der zudem auf den homologen Stamm beschränkt ist [5, 113, 114]. Shirai *et al.* zeigten dagegen bereits 1976, dass T-Zellen aus immunisierten Mäusen Schutz gegen eine *O. tsutsugamushi* Infektion in nicht-immunisierten Mäusen vermitteln können [5]. $CD8^+$ T-Zellen im peripheren Blut von *O. tsutsugamushi* infizierten Patienten expandieren während der Konvaleszenzphase der Erkrankung. Dabei zeigen über 60 % der $CD8^+$ T-Zellen einen $CD45RA^-CCR7^-$ Effektorgedächtnis-Phänotyp [162]. Im Mausmodell wurden T-Zell Subpopulationen bisher jedoch kaum differenziert untersucht.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in subkutan mit *O. tsutsugamushi* infizierten BALB/c Mäusen im regionalen Lymphknoten und in der Milz expandierten, wobei sich das Verhältnis in Richtung der $CD8^+$ T-Zellen verschob. In der Lunge zeigte sich eine ausgeprägte Expansion von T-Zellen, bei der $CD8^+$ T-Zellen klar überwogen. Die Anzahl von $CD3^-DX5^+$ NK-Zellen war nach einer Woche p.i. ansteigend. Obwohl eine DX5-Expression auch auf eosinophilen Granulozyten beschrieben wurde [163, 164], ist es unwahrscheinlich, dass diese Population einen relevanten Anteil im Lymphozyten-Gate ausmacht.

Die Bedeutung von $CD8^+$ T-Zellen für die Abwehr zytoplasmatisch replizierender Erreger wurde bereits in vielen Infektionsmodellen gezeigt [165, 166]. Dennoch können in einigen Modellen auch andere Zelltypen unabhängig von $CD8^+$ T-Zellen einen Schutz vermitteln. So wurde bei dem fakultativ zytoplasmatisch replizierenden Bakterium *Francisella tularensis* [77, 78] und dem Vaccinia-Virus [79, 80] gezeigt, dass $CD8^+$ T-Zellen entbehrlich sind. Deshalb war es wichtig, die Relevanz von $CD8^+$ T-Zellen auch für die Immunabwehr gegen *O. tsutsugamushi* zu zeigen. Dazu wurden $CD8^+$ T-Zellen während der Infektion depletiert. Außerdem wurden $\beta_2m^{-/-}$ Mäuse mit dem Erreger infiziert. In beiden Experimenten wurden eine höhere Bakteriämie während der Effektorphase sowie ein vermindertes Überleben gegenüber den Kontrollgruppen gezeigt. Ebenso wie die Immunreaktionen gegen *Rickettsia typhi* [156], und anderer Vertreter der Rickettsiaceae [167], scheint eine protektive Immunreaktion gegen *O. tsutsugamushi* also abhängig von $CD8^+$ T-Zellen zu sein.

Peptide, die über MHC-I auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen präsentiert werden, dienen als Epitope für $CD8^+$ T-Zellen. Die Kenntnis immundominanter $CD8^+$ T-Zell Epitope würde eine funktionelle Charakterisierung antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen ermöglichen. Insbesondere könnten mit Hilfe der Tetramer-/ Pentamertechnologie ihre Anzahl und ihr Aktivierungsstatus im Infektionsverlauf analysiert werden. Außerdem könnte die zytotoxische Aktivität *in vivo* oder *in vitro* unter Verwendung von transformierten Zellen untersucht werden, die relevante Peptide überexprimieren.

Dominante $CD8^+$ T-Zell Epitope konnten bereits in dem abundant exprimierten und Oberflächen-assoziierten Protein *OmpB* von *R. conorii* gezeigt werden [82, 168]. Für die ebenfalls abundant exprimierten *L. monocytogenes* Proteine LLO und p60 [169] wurden sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zell Epitope gefunden [81]. DNA-Vakzinierung mit einem 56 kDa Plasmid konnte einen teilweisen Schutz gegen den tödlichen Verlauf einer murinen *O. tsutsugamushi* Infektion vermitteln, der nicht mit der Antikörperreaktion korrelierte [115]. Deshalb wurde ein MHC-I Epitop im 56 kDa Protein vermutet, welches eine effektive $CD8^+$ T-Zell Antwort gegen *O. tsutsugamushi* ermöglicht. Deshalb, und weil die 47 kDa und 56 kDa Proteine von *O. tsutsugamushi* abundant auf der Oberfläche exprimiert werden [170, 171] und starke Antikörperreaktionen hervorriefen, wurden diese Proteine auf Anwesenheit von $CD8^+$ T-Zell Epitopen getestet.

47 kDa und 56 kDa Fusionsproteine, welche das H-$2K^b$ Epitop $Ova_{257-264}$ enthielten (iC2-47 und iC2-56), wurden in H-$2K^b$ restringierten 232-Makrophagen intrazellulär exprimiert. Die Zellen waren in der Lage Splenozyten von OT-I Mäusen zu stimulieren, die einen $Ova_{257-264}$

spezifischen transgenen T-Zell Rezeptor exprimieren, wodurch die zytoplasmatische Expression der Fusionsproteine und ihr Abbau im Phagosom bestätigt wurden. $CD8^+$ T-Zellen infizierter C57BL/6 Mäuse reagierten auf eine anti-CD3-Stimulation mit der Expression von IFN-γ, wodurch die prinzipielle Reaktionsfähigkeit der Zellen gezeigt wurde. Splenozyten infizierter C57BL/6 Mäuse zeigten jedoch keine erhöhte Frequenz IFN-γ^+ oder TNF-α^+ $CD8^+$ T-Zellen in einer durchflusszytometrischen Analyse nach Stimulation mit iC2-47 oder iC2-56 transduzierten Makrophagen. Lediglich in einem IFN-γ ELISA aus Splenozyten-Kulturüberständen konnte eine schwach gesteigerte IFN-γ Konzentration nach Stimulation mit iC2-56 transduzierten Makrophagen beobachtet werden. Das Ergebnis legt nahe, dass die 47 kDa und 56 kDa *O. tsutsugamushi* Proteine keine immundominanten H-$2K^b$ Epitope enthalten. Es ist jedoch möglich, dass *O. tsutsugamushi* viele $CD8^+$ T-Zell Epitope bereitstellt, die jeweils nur einen äußerst geringen Teil der $CD8^+$ T-Zell Reaktivität ausmachen. Auch für *L. monocytogenes* wurden äußerst geringe Frequenzen spezifischer $CD8^+$ T-Zellen selbst für die potentesten bekannten $CD8^+$ T-Zell Epitope berichtet [172]. Daher ist nicht auszuschließen, dass das 47 kDa oder insbesondere das 56 kDa Protein in einer *O. tsutsugamushi* Infektion subdominante Epitope mit niedriger Frequenz antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen bereitstellt.

Während virale Proteine, die durch zelluläre Ribosomen translatiert werden, i.d.R. frei im Zytoplasma vorkommen, ist dies bei zytoplasmatisch replizierenden Bakterien nicht gewährleistet. Hier können Proteine in den Erregerzellen bzw. auf ihrer Oberfläche exprimiert werden oder in das Wirtszellzytoplasma entlassen werden. Wie im Fall der Listerien-Proteine LLO und p60 können immundominante Epitope in sezernierten Proteinen liegen. Shen *et al.* konnten zeigen, dass auch Proteine die innerhalb des Erregers exprimiert werden eine Quelle von Epitopen sein können. Allerdings sind nur *APC*s in der Lage solche Epitope zu präsentieren, weil hierfür zunächst die Degradation der Erreger notwendig ist. Daher können diese Epitope zwar eine $CD8^+$ T-Zell Antwort initiieren, jedoch werden sie auf Zellen, die den Erreger nicht ohne Stimulation degradieren können, auch nicht präsentiert. Eine Erkennung durch epitopspezifische $CD8^+$ T-Zellen ist in diesem Fall also nicht möglich [173]. Integrale Membranproteine sind ebenso betroffen. So wurde gezeigt, dass das Listerienprotein ActA, wenn es nativ, d.h. als integrales Membranprotein exprimiert wird, $CD8^+$ T-Zell Antworten initiiert aber keine $CD8^+$ T-Zell vermittelte Erregerbekämpfung ermöglicht. Eine $CD8^+$ T-Zell vermittelte Erregerbekämpfung ist jedoch möglich, wenn ActA in das Zytosol von Zielzellen eingebracht wird [174, 175]. Die Suche nach immundominanten Epitopen bei *O. tsutsugamushi* sollte deshalb auch auf sekretorische Proteine ausgeweitet werden. Interes-

sant ist in diesem Zusammenhang das hochrepetitive Genom von *O. tsutsugamushi*, welches vor allem Gene des Typ IV Sekretionssystem und vermutete sekretorische Proteine betrifft [19]. Es ist denkbar, dass diese Genproliferation mit einem Immunevasionsmechanismus in Verbindung steht. So könnten die Allele zeitlich versetzt, zelltypspezifisch oder organspezifisch differenziell reguliert werden um antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zell Funktionen zu entkommen. Ein vergleichbarer Mechanismus wurde bereits bei antikörpervermittelten Reaktionen gegen *Trypanosoma* spec. beschrieben [176].

5.3 Funktionelle Charakterisierung von Lymphozyten

Funktionell zeigten Überstände *ex vivo* isolierter Zellen von *O. tsutsugamushi* infizierten Mäusen nach T-Zell Stimulation mit anti-CD3 ein IFN-γ dominiertes Zytokinmillieu mit Beteiligung von proinflammatorischem TNF-α und Suppression von IL-4.

IFN-γ ist in vielen Modellsystemen das Leitzytokin einer erfolgreichen Immunreaktion gegen intrazelluläre Erreger [69, 177]. Unter Berücksichtigung der Populationsgrößen und der Frequenzen von IFN-γ^+ Zellen wurde im hier vorgestellten Modell gezeigt, dass IFN-γ hauptsächlich von $CD8^+$ T-Zellen exprimiert wird, wobei in der frühen Phase nach der Infektion auch NK-Zellen eine entscheidende Quelle sein könnten. Es gilt außerdem zu bedenken, dass $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen teilweise unterschiedliche Funktionen wahrnehmen und aufgrund ihrer Antigenrezeptoren unterschiedliche Zellinteraktionen eingehen können. Insbesondere könnten IFN-γ produzierende $CD4^+$ T-Zellen und NK-Zellen in der frühen Phase der Infektion für die Etablierung einer protektiven $CD8^+$ T-Zell vermittelten Immunantwort [178-180], oder für die Rekrutierung von $CD8^+$ T-Zellen in die Lunge [181] entscheidend sein. Es ist bekannt, dass Splenozyten von *O. tsutsugamushi* infizierten Mäusen IFN-γ produzieren [65, 66] und *DTH*-Reaktionen auftreten, wenn *O. tsutsugamushi* Antigen intradermal in infizierte Mäuse injiziert wird [6]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich gezeigt, dass ein IFN-γ dominiertes Zytokinmillieu auch am Ort der Erregerbekämpfung, der Lunge, vorherrscht. Deshalb wurde die Bedeutung von IFN-γ während der Immun-Effektorphase einer *O. tsutsugamushi* Infektion durch *in vivo* Neutralisierung mit einem monoklonalen Antikörper gegen IFN-γ analysiert. Während in den Kontrollen die *O. tsutsugamushi* Erregerlast während dritten Woche nach der Infektion rückläufig war, stieg die Erregerlast in anti-IFN-γ behandelten Mäusen tendeziell an. Diese Beobachtung zeigte, dass IFN-γ einen protektiven Einfluss in der Effektorphase einer *O. tsutsugamushi* Infektion hatte. Gleichzeitig verbesserten sich jedoch auch die Krankheitssymptome wenn IFN-γ neu-

tralisiert wurde. IFN-γ scheint also auch immunpathologische Wirkungen in einer *O. tsutsugamushi* Infektion zu vermitteln.

Moderat gesteigerte Konzentrationen von TNF-α bei *O. tsutsugamushi* infizierten Mäusen wurden in Zellkulturüberständen sowohl nach Restimulation mit anti-CD3 als auch (tendenziell) nach antigener Stimulation gemessen. Eine gesteigerte intrazelluläre Expression von TNF-α in NK-Zellen oder T-Zellen infizierter Tiere wurde nicht gemessen. Grund für diese Diskrepanz könnte die geringere Sensitivität der intrazellulären Färbung sein. Möglich ist jedoch auch, dass TNF-α nicht von T-Zellen exprimiert wird, sondern von anderen Zellen, wie möglicherweise von Makrophagen. Die gesteigerte TNF-α Konzentration in Überständen von mit anti-CD3 stimulierten Zellen könnte in diesem Fall durch eine Aktivierung der Makrophagen durch *in situ* produziertes IFN-γ erklärt werden [182]. TNF-α wirkt proinflammatorisch, wirkt also an der Rekrutierung von Leukozyten an den Infektionsort mit und kann die Wirkung von IFN-γ auf Makrophagen verstärken [183]. Für *R. conorii* wurde die Bedeutung von TNF-α auf das Überleben und die Erregerlast im Gewebe gezeigt [184]. Andererseits wurde bereits berichtet, dass hohe TNF-α Konzentrationen in humanen *O. tsutsugamushi* Infektionen mit schweren Verlaufsformen der Erkrankung assoziiert sind [185]. Die Bedeutung von TNF-α sollte daher auch in dem hier vorgestellten Infektionsmodell näher analysiert werden.

Die Proliferation von Zellen aus der Milz und der Lunge infizierter Tiere war nach Stimulation mit anti-CD3 vermindert und blieb bei Zellen aus den Lymphknoten auf Hintergrundniveau. Ebenso wurde eine, gegenüber den Kontrollen verminderte IL-2 Produktion gemessen. Murines IL-2 hat *in vitro* eine Halbwertszeit von über 2 Tagen [186], daher kann die verminderte IL-2 Konzentration kein Artefakt der Langzeitkultivierung sein. Da IL-2 mit dem Proliferationspotential assoziiert ist, ist es ebenso unwahrscheinlich, dass die verminderte Proliferationsfähigkeit durch die Langzeitkultivierung verursacht ist. Auch Jerrels *et al.* berichteten eine verminderte Proliferation von Splenozyten gegenüber Mitogenen in einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* [187]. Immunhistologisch wurde jedoch ein gesteigertes Proliferationspotenzial in der Lunge mit dem Marker Ki-67 gezeigt (Neumann, Keller; unveröffentlicht). Außerdem wurde im Zeitverlauf der Infektion eine Expansion von T-Zellen in den regionalen Lymphknoten sowie insbesondere in der Lunge gemessen.

Der Phänotyp von $CD8^+$ T-Zellen 21 Tage p.i. ist durch eine verminderte Expression von CD62L, CD3 und CD8 gekennzeichnet. Grisotto *et al.* konnten einen ähnlichen $CD8^+$ T-Zell Phänotyp in einer chronischen Infektion mit *Trypanosoma cruzi* beobachten. Dieser war

durch verminderte Expression von CD62L, CD8 und αβ-TCR gekennzeichnet [188]. Interessanterweise waren die Zielorgane des Erregers und die Milz, jedoch nicht die Lymphknoten betroffen. Auch im hier vorgestellten Modell der *O. tsutsugamushi* Infektion konnte keine verminderte CD8 und CD3 Expression in den Lymphknoten beobachtet werden (Daten nicht abgebildet). Das CD8 Molekül ist für die Peptidsensitivität des T-Zell Rezeptor Komplexes entscheidend. So wurde gezeigt, dass CD8 die Sensitivität um den Faktor 10^6 erhöht [189]. Auch bei Infektionen mit *L. monocytogenes* und Vaccinia-Virus konnte eine verminderte CD8 Expression gezeigt werden. Die Autoren postulierten, dass auf diese Weise die $CD8^+$ T-Zell Antwort auf Zellen beschränkt sein könnte, die hohe Epitopkonzentrationen auf ihrer Oberfläche exprimieren, und dass auf diese Weise kollaterale Schäden (Immunpathologie) minimiert werden könnten [190].

$CD8^+$ T-Zellen, die schrittweise erst die Produktion von IL-2 und die Proliferationskapazität vermindern, anschließend die Fähigkeit zur Zytotoxizität und zur Produktion von TNF-α sowie schließlich die Produktion von IFN-γ einstellen und vermehrt apoptotisch werden, sind bei persistierenden viralen Infektionen, insbesondere bei LCMV bekannt [191]. Der Verlust zentraler Effektormechanismen geht hierbei unter anderem mit einer erhöhten Expression von PD-1 einher [192]. Diese Zellen werden als *exhausted $CD8^+$ T cells* bezeichnet [193] (*Review*: [194]). Ein typisches Merkmal ist die Möglichkeit durch durch blockierende Antikörper gegen PD-1 oder PD-L1 eine verstärkte Immunreaktion mit effektiver Virusbekämpfung herbeizuführen [192]. Der Phänotyp der $CD8^+$ T-Zellen entspricht in einigen Punkten, insbesondere der verminderten Proliferation sowie der verminderten Expression von IL-2 und TNF-α dem hier vorgestellten $CD8^+$ T-Zell Phänotyp in der *O. tsutsugamushi* Infektion, desweiteren konnten Cho *et al.* im peripheren Blut von *O. tsutsugamushi* infizierten Patienten eine verstärkte Apoptose, repräsentiert durch den Marker Annexin V, sowie einen erhöhten Anteil $PD\text{-}1^+$ $CD8^+$ T-Zellen zeigen [162]. Unterschiede zu den *exhausted $CD8^+$ T cells* wie sie im LCMV Modell beschrieben wurden liegen in der früh herunter regulierten Expression von TNF-α sowie in der, insbesondere in der späten Phase der akuten Infektion noch äußerst starken Expression von IFN-γ. Um die Bedeutung des *exhausted $CD8^+$ T cell* Phänotyps für die Persistenz in der *O. tsutsugamushi* Infektion besser zu verstehen sollte die Expression von PD-1 durchflusszytometrisch im Mausmodell charakterisiert werden und der Einfluss von anti-PD-1 oder anti-PD-L1 mAk auf den Infektionsverlauf untersucht werden.

5.4 IFN-γ-abhängige Effektormechanismen von Makrophagen

Für die effektive Bekämpfung von *O. tsutsugamushi* müssen Makrophagen durch zusätzliche Stimulation z.B. mit IFN-γ aktiviert werden [67, 195, 196]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein positiver Einfluss von IFN-γ auf die Erregerbekämpfung durch Makrophagen gezeigt werden.

Einzelne Effektormechanismen aktivierter Makrophagen wurden pharmakologisch inhibiert um ihren Einfluss auf die Erregerlast zu untersuchen. Der kompetitive *iNOS* Inhibitor NMMA [197] konnte die Erregerbekämpfung signifikant abschwächen. Ein Einfluss von Tryptophan-Deprivation durch kompetitive Inhibition von IDO mit 1-MT [198] konnte nicht gezeigt werden. Seit einigen Jahren wurde in verschiedenen Infektionsmodellen gezeigt, dass auch Autophagie ein Mechanismus der Bekämpfung intrazellulärer Erreger darstellt [134-137]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch durch Inhibition der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) mit Wortmannin [199] kein Einfluss von Autophagie auf die Bekämpfung von *O. tsutsugamushi* in Makrophagen beobachtet werden.

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit die Inhibition des Tryptophan katabolisierenden Enzyms IDO keinen Einfluss auf die Erregerlast hatte, zeigten Prachason *et al.* dass *O. tsutsugamushi* in der humanen Makrophagen Zelllinie THP-1 durch IDO-abhängige Tryptophan-Deprivation bekämpft werden kann [196]. Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass die Transkription von IDO-mRNA durch IFN-γ induziert wird. Massenspektrometrisch konnten sie zeigen, dass in infizierten und mit IFN-γ aktivierten THP-1 Makrophagen Tryptophan depriviert wird, und insbesondere, dass das *O. tsutsugamushi* Wachstum nicht mehr inhibiert wird, wenn Tryptophan ersetzt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression bzw. die Funktion von IDO in den hier verwendeten 232-Makrophagen nicht überprüft. Es ist denkbar, dass diese Zelllinie keine starke IDO Aktivität aufweist. Ein weiterer Unterschied im experimentellen Ablauf ist der verwendete *O. tsutsugamushi* Stamm. Es ist möglich, dass der von Prachason *et al.* verwendete Kato Stamm sensibler auf die Deprivation von Tryptophan reagiert als der hier verwendete Karp Stamm.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine *iNOS*-abhängige Reduktion der Erregerlast in 232-Makrophagen gezeigt, die mit dem *O. tsutsugamushi* Karp Stamm infiziert und mit IFN-γ aktiviert wurden. Fukuhara *et al.* konnten dagegen keine Produktion von NO in Exsudat-Makrophagen beobachten, die mit dem *O. tsutsugamushi* Karp Stamm infiziert wurden. Makrophagen, die mit dem *O. tsutsugamushi* Stamm Kuroki infiziert wurden, produzierten jedoch

NO, obwohl die Makrophagen nicht mit IFN-γ stimuliert worden waren. Dennoch hatte NO hier keine Wirkung gegen den Erreger [200]. Eine denkbare Erklärung für die zunächst widersprüchlichen Ergebnisse ist, dass der Stamm Kuroki intrinsische Faktoren besitzt, die zu einer Aktivierung der Makrophagen führt, gleichzeitig aber einem Angriff durch NO oder NO-abhängige Effektormechanismen wie die Induktion von Apoptose [124] besser standhalten. Der Stamm Karp könnte entsprechend weniger aktivierend auf Makrophagen wirken und gleichzeitig empfindlicher auf NO-abhängige Effektormechanismen reagieren.

Während in der vorliegenden Arbeit eine *iNOS*-abhängige Erregerbekämpfung durch Makrophagen gezeigt wurde, konnten Fukuhara *et al.* keinen Einfluss von *iNOS* auf die Erregerbekämpfung beobachten. Prachason *et al.* konnten zudem überzeugend eine erfolgreiche Erregerbekämpfung durch IDO-abhängige Mechanismen zeigen, die in der vorliegenden Arbeit nicht gemessen wurde. Um die beteiligten Effektormechanismen sowie den Einfluss des *O. tsutsugamushi* Stammes und aktivierender Faktoren zu verstehen, ist weitere Forschung nötig.

Literaturverzeichnis

1. Ewing EP, Jr., Takeuchi A, Shirai A, Osterman JV: **Experimental infection of mouse peritoneal mesothelium with scrub typhus rickettsiae: an ultrastructural study**. *Infect Immun* 1978, **19**(3):1068-1075.
2. Kramme S, An le V, Khoa ND, Trin le V, Tannich E, Rybniker J, Fleischer B, Drosten C, Panning M: **Orientia tsutsugamushi bacteremia and cytokine levels in Vietnamese scrub typhus patients**. *J Clin Microbiol* 2009, **47**(3):586-589.
3. Urakami H, Tsuruhara T, Tamura A: **Penetration of Rickettsia tsutsugamushi into cultured mouse fibroblasts (L cells): an electron microscopic observation**. *Microbiology and immunology* 1983, **27**(3):251-263.
4. Kawamura A, Tanaka H, Tamura A: **Tsutsugamushi Disease**. *University of Tokyo Press* 1995.
5. Shirai A, Catanzaro PJ, Phillips SM, Osterman JV: **Host defenses in experimental scrub typhus: role of cellular immunity in heterologous protection**. *Infect Immun* 1976, **14**(1):39-46.
6. Jerrells TR, Osterman JV: **Host Defenses in Experimental Scrub Typhus: Delayed-Type Hypersensitivity Responses of Inbred Mice**. *Infection and Immunity* 1982, **35**(1):117-123.
7. Smadel JE, Ley HL, Jr., Diercks RH, Cameron JA: **Persistence of Rickettsia tsutsugamushi in tissues of patients recovered from scrub typhus**. *Am J Hyg* 1952, **56**(3):294-302.
8. Chung MH, Lee JS, Baek JH, Kim M, Kang JS: **Persistence of Orientia tsutsugamushi in humans**. *J Korean Med Sci* 2012, **27**(3):231-235.
9. Fox JP: **The long persistence of Rickettsia orientalis in the blood and tissues of infected animals**. *J Immunol* 1948, **59**(2):109-114.
10. Shirai A, Chan TC, Gan E, Huxsoll DL: **Persistence and reactivation of Rickettsia tsutsugamushi infections in laboratory mice**. *Jpn J Med Sci Biol* 1979, **32**(3):179-184.
11. Tamura A, Urakami H, Ohashi N: **A comparative view of Rickettsia tsutsugamushi and the other groups of rickettsiae**. *Eur J Epidemiol* 1991, **7**(3):259-269.
12. Amano K, Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Kaya S, Fukushi K: **Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in Rickettsia tsutsugamushi**. *Infect Immun* 1987, **55**(9):2290-2292.
13. Min C-K, Yang J-S, Kim S, Choi M-S, Kim I-S, Cho N-H: **Genome-Based Construction of the Metabolic Pathways of Orientia tsutsugamushi and Comparative Analysis within the Rickettsiales Order**. *Comparative and Functional Genomics* 2008, **2008**:1-15.
14. Hayashi N: **Etiology of Tsutsugamushi Disease**. *The Journal of Parasitology* 1920, **7**(2):53-68.

15. Nagayo M, Tamiya T, Mitamura T, SATO K: **The Virus of the Tsutsugamushi Disease.** *Compte rendu des seances de la Societe de biologie* 1930, **104**:637-641.

16. Ogata N: **Aetiologie der Tsutsugamushikrankheit: Rickettsia tsutsugamushi.** *Zbl f Bakt* 1931, **122**:249-253.

17. Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Miyamura S: **Classification of Rickettsia tsutsugamushi in a new genus, Orientia gen. nov., as Orientia tsutsugamushi comb. nov**. *Int J Syst Bacteriol* 1995, **45**(3):589-591.

18. Nakayama K, Yamashita A, Kurokawa K, Morimoto T, Ogawa M, Fukuhara M, Urakami H, Ohnishi M, Uchiyama I, Ogura Y *et al*: **The Whole-genome Sequencing of the Obligate Intracellular Bacterium Orientia tsutsugamushi Revealed Massive Gene Amplification During Reductive Genome Evolution**. *DNA Research* 2008, **15**(4):185-199.

19. Cho NH, Kim HR, Lee JH, Kim SY, Kim J, Cha S, Darby AC, Fuxelius HH, Yin J, Kim JH *et al*: **The Orientia tsutsugamushi genome reveals massive proliferation of conjugative type IV secretion system and host-cell interaction genes**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, **104**(19):7981-7986.

20. Rapmund G, Upham RW, Kundin WD, Manikumaran C, Chan TC: **Transovarial development of scrub typhus rickettsiae in a colony of vector mites**. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1969, **63**(2):251-258.

21. Phasomkusolsil S, Tanskul P, Ratanatham S, Watcharapichat P, Phulsuksombati D, Frances SP, Lerdthusnee K, Linthicum KJ: **Transstadial and transovarial transmission of Orientia tsutsugamushi in Leptotrombidium imphalum and Leptotrombidium chiangraiensis (Acari: Trombiculidae)**. *J Med Entomol* 2009, **46**(6):1442-1445.

22. Rapmund G, Dohany AL, Manikumaran C, Chan TC: **Transovarial transmission of Rickettsia tsutsugamushi in Leptotrombidium (Leptotrombidium) arenicola Traub (Acarina: Trombiculidae)**. *J Med Entomol* 1972, **9**(1):71-72.

23. Takahashi M, Murata M, Nogami S, Hori E, Kawamura A, Jr., Tanaka H: **Transovarial transmission of Rickettsia tsutsugamushi in Leptotrombidium pallidum successively reared in the laboratory**. *Jpn J Exp Med* 1988, **58**(5):213-218.

24. Frances SP, Watcharapichat P, Phulsuksombati D: **Vertical transmission of Orientia tsutsugamushi in two lines of naturally infected Leptotrombidium deliense (Acari : Trombiculidae)**. *Entomological Society of America* 2001, **38**(1):17-21.

25. Urakami H, Takahashi M, Hori E, Tamura A: **An ultrastructural study of vertical transmission of Rickettsia tsutsugamushi during oogenesis and spermatogenesis in Leptotrombidium pallidum**. *Am J Trop Med Hyg* 1994, **50**(2):219-228.

26. Kadosaka T, Kimura E: **Electron microscopic observations of Orientia tsutsugamushi in salivary gland cells of naturally Infected Leptotrombidium pallidum larvae during feeding**. *Microbiol Immunol* 2003, **47**(10):727-733.

27. SC Oaks J, Ridgway R, Shirai A, Twartz J: **Scrub Typhus**. *Institut Penyeliddikan Perubatan* 1983, **21**.

28. Balcells ME, Rabagliati R, Garcia P, Poggi H, Oddo D, Concha M, Abarca K, Jiang J, Kelly D, Richards A *et al*: **Endemic Scrub Typhus-like Illness, Chile**. *Emerging Infectious Diseases* 2011, **17**(9):1659-1663.

29. Izzard L, Fuller A, Blacksell SD, Paris DH, Richards AL, Aukkanit N, Nguyen C, Jiang J, Fenwick S, Day NPJ *et al*: **Isolation of a Novel Orientia Species (O. chuto**

sp. nov.) from a Patient Infected in Dubai. *Journal of Clinical Microbiology* 2010, **48**(12):4404-4409.

30. Ghorbani R, JAIN M, WALKER D: **A case of scrub typhus probably acquired in Africa**. Oxford, Royaume-Uni: Oxford University Press; 1997.
31. Paris DH, Phetsouvanh R, Tanganuchitcharnchai A, Jones M, Jenjaroen K, Vongsouvath M, Ferguson DP, Blacksell SD, Newton PN, Day NP *et al*: **Orientia tsutsugamushi in human scrub typhus eschars shows tropism for dendritic cells and monocytes rather than endothelium**. *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**(1):e1466.
32. Pongponratn E, Maneerat Y, Chaisri U, Wilairatana P, Punpoowong B, Viriyavejakul P, Riganti M: **Electron-microscopic examination of Rickettsia tsutsugamushi-infected human liver**. *Trop Med Int Health* 1998, **3**(3):242-248.
33. Tseng BY, Yang HH, Liou JH, Chen LK, Hsu YH: **Immunohistochemical study of scrub typhus: a report of two cases**. *Kaohsiung J Med Sci* 2008, **24**(2):92-98.
34. Moron CG, Popov VL, Feng HM, Wear D, Walker DH: **Identification of the target cells of Orientia tsutsugamushi in human cases of scrub typhus**. *Mod Pathol* 2001, **14**(8):752-759.
35. Yotsukura M, Aoki N, Fukuzumi N, Ishikawa K: **Review of a case of tsutsugamushi disease showing myocarditis and confirmation of Rickettsia by endomyocardial biopsy**. *Japanese circulation journal* 1991, **55**(2):149-153.
36. Kim DM, Kang DW, Kim JO, Chung JH, Kim HL, Park CY, Lim SC: **Acute renal failure due to acute tubular necrosis caused by direct invasion of Orientia tsutsugamushi**. *J Clin Microbiol* 2008, **46**(4):1548-1550.
37. Kundin WD, Liu C, Harmon P, Rodina P: **Pathogenesis of Scrub Typhus Infection (Rickettsia Tsutsugamushi) as Studied by Immunofluorescence**. *J Immunol* 1964, **93**:772-781.
38. Murata M, Sudo K, Suzuki K, Aoyama Y, Nogami S, Tanaka H, Kawamura A, Jr.: **Proliferating sites of Rickettsia tsutsugamushi in mice by different routes of inoculation evidenced with immunofluorescence**. *Jpn J Exp Med* 1985, **55**(5):193-199.
39. Whitworth T, Popov VL, Yu X-J, Walker DH, Bouyer DH: **Expression of the Rickettsia prowazekii pld or tlyC Gene in Salmonella enterica Serovar Typhimurium Mediates Phagosomal Escape**. *Infection and Immunity* 2005, **73**(10):6668-6673.
40. Sudhakar M, Rajendran A: **Scrub Typhus in Adults - A Case Series from a Tertiary Care Hospital**. *International Journal of Medicine and Public Health* 2011, **1**(2):34-36.
41. Saah A: **Orientia tsutsugamushi (scrub typhus)**. *Principles and practice of infectious disease, 5th edition (GL Mandell, R Dolin)* 2000:2056-2057.
42. Jeong YJ, Kim S, Wook YD, Lee JW, Kim K-I, Lee SH: **Scrub Typhus: Clinical, Pathologic, and Imaging Findings**. *Radiographics* 2007, **27**(1):161-172.
43. Joklik W, Willet H, Amos D, Wilfert C: **Zinsser microbiology, 20th edition**. 1992:700-718.
44. Hsu Y-H, Chen HI: **Pulmonary pathology in patients associated with scrub typhus**. *Pathology* 2008, **40**(3):268-271.
45. Levine H: **Pathologic study of thirty-one cases of scrub typhus fever with especial reference to the cardiovascular system**. *Am Heart J* 1946, **31**:314-328.
46. Silpapojakul K, Ukkachoke C, Krisanapan S, Silpapojakul k: **Rickettsial meningitis and encephalitis**. *Archives of Internal Medicine* 1991, **151**(9):1753-1757.

47. Pai H, Sohn S, Seong Y, Kee S, Chang WH, Choe KW: **Central nervous system involvement in patients with scrub typhus**. *Clin Infect Dis* 1997, **24**(3):436-440.

48. Settle E, Pinkerton H, Corbett A: **A pathologic study of tsutsugamushi disease (scrub typhus) with notes on clinicopathologic correlation.** *J Lab Clin Med Arh* 1945, **30**:639–661.

49. Coleman RE, Sangkasuwan V, Suwanabun N, Eamsila C, Mungviriya S, Devine P, Richards AL, Rowland D, Ching W-M, Sattabongkot J *et al*: **Comparative evaluation of selected diagnostic assays for the detection of IgG and IgM antibody to Orientia tsutsugamushi in Thailand**. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002, **67**(5):497-503.

50. Koh GCKW, Maude RJ, Paris DH, Newton PN, Blacksell SD: **Diagnosis of Scrub Typhus**. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010, **82**(3):368-370.

51. Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Kawamori F, Yamamoto S, Ohashi N, Tamura A, Kawamura A: **Specific amplification of Rickettsia tsutsugamushi DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction**. *Journal of Clinical Microbiology* 1991, **29**(11):2628-2630.

52. Kelly DJ, Marana DP, Stover CK, Oaks EV, Carl M: **Detection of Rickettsia tsutsugamushi by Gene AmpUcation Using Polymerase Chain Reaction Techniques"a**. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1990, **590**(1):564-571.

53. Singhsilarak T, Leowattana W, Looareesuwan S, Wongchotigul V, Jiang J, Richards AL, Watt G: **Detection of Orientia tsutsugamushi in clinical samples by quantitative real-time Polymerasae chain reaction**. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005, **72**(5):640-641.

54. Rajapakse S, Rodrigo C, Fernando SD: **Drug treatment of scrub typhus**. *Trop Doct* 2011, **41**(1):1-4.

55. Corwin A, Soderquist R, Suwanabun N, Sattabongkot J, Martin L, Kelly D, Beecham J: **Scrub typhus and military operations in Indochina**. Oxford, ROYAUME-UNI: Oxford University Press; 1999.

56. Watt G, Chouriyagune C, Ruangweerayud R, Watcharapichat P, Phulsuksombati D, Jongsakul K, Tejaisavadharm P, Bhodhidatta D, Corcoran K, Dasch G: **Scrub typhus infections poorly responsive to antibiotics in northern Thailand**. *The Lancet* 1996, **348**(9020):86-89.

57. Strickman D, Sheer T, Salata K, Hershey J, Dasch G, Kelly D, Kuschner R: **In vitro effectiveness of azithromycin against doxycycline-resistant and -susceptible strains of Rickettsia tsutsugamushi, etiologic agent of scrub typhus**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995, **39**(11):2406-2410.

58. Chattopadhyay S, Richards AL: **Scrub typhus vaccines: past history and recent developments**. *Hum Vaccin* 2007, **3**(3):73-80.

59. Coleman RE, Monkanna T, Linthicum KJ, Strickman DA, Frances SP, Tanskul P, Kollars TM, Inlao I, Watcharapichat P, Khlaimanee N *et al*: **Occurrence of Orientia tsutsugamushi in small mammals from thailand**. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2003, **69**(5):519-524.

60. Lurchachaiwong W, Monkanna T, Leepitakrat S, Ponlawat A, Sattabongkot J, Schuster AL, McCardle PW, Richards AL: **Variable clinical responses of a scrub typhus outbred mouse model to feeding by Orientia tsutsugamushi infected mites**. *Exp Appl Acarol* 2012, **58**(1):23-34.

61. Frances SP, Watcharapichat P, Phulsuksombati D: **Development and persistence of antibodies to Orientia tsutsugamushi in the roof rat, Rattus rattus and laboratory mice following attachment of naturally infected Leptotrombidium deliense**. *Acta Tropica* 2000, **77**(3):279-285.

62. Groves MG, Kelly DJ: **Characterization of factors determining Rickettsia tsutsugamushi pathogenicity for mice**. *Infect Immun* 1989, **57**(5):1476-1482.

63. Hwang TS, Chu YC, Kim YB, Lim BU, Kang JS: **Pathologic study of mice infected with Rickettsia tsutsugamushi R19 strain**. *J Korean Med Sci* 1993, **8**(6):437-445.

64. Kuwata T: **Analysis of immunity in experimental Tsutsugamushi disease**. *J Immunol* 1952, **68**(2):115-120.

65. Palmer BA, Hetrick FM, Jerrells TJ: **Production of gamma interferon in mice immune to Rickettsia tsutsugamushi**. *Infect Immun* 1984, **43**(1):59-65.

66. Palmer BA, Hetrick FM, Jerrells TR: **Gamma interferon production in response to homologous and heterologous strain antigens in mice chronically infected with Rickettsia tsutsugamushi**. *Infect Immun* 1984, **46**(1):237-244.

67. Nacy CA, Osterman JV: **Host defenses in experimental scrub typhus: role of normal and activated macrophages**. *Infect Immun* 1979, **26**(2):744-750.

68. Nacy CA, Meltzer MS: **Macrophages in resistance to rickettsial infections: protection against lethal Rickettsia tsutsugamushi infections by treatment of mice with macrophage-activating agents**. *Journal of Leukocyte Biology* 1984, **35**(4):385-396.

69. Moll H, Scollay R, Mitchell GF: **Resistance to cutaneous leishmaniasis in nude mice injected with L3T4+ T cells but not with Ly-2+ T cells**. *Immunol Cell Biol* 1988, **66**(1):57-63.

70. Howard J, Hale C, Liew F: **Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. IV. Prophylactic effect of sublethal irradiation as a result of abrogation of suppressor T cell generation in mice genetically susceptible to leishmania tropica**. *The Journal of Experimental Medicine* 1981, **153**(3):557-568.

71. Hill JO, Awwad M, North RJ: **Elimination of CD4+ suppressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8+ T lymphocytes to mediate protective immunity against Leishmania**. *The Journal of Experimental Medicine* 1989, **169**(5):1819-1827.

72. Suzuki Y, Remington JS: **Dual regulation of resistance against Toxoplasma gondii infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice**. *The Journal of Immunology* 1988, **140**(11):3943-3946.

73. Czuprynski CJ, Brown JF: **Effects of purified anti-Lyt-2 mAb treatment on murine listeriosis : comparative roles of Lyt-2[+] and L3T4[+] cells in resistance to primary and secondary infection, delayed-type hypersensitivity and adoptive transfer of resistance**, vol. 71. Oxford, ROYAUME-UNI: Blackwell; 1990.

74. Ladel CH, Flesch IE, Arnoldi J, Kaufmann SH: **Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on Listeria monocytogenes infection**. *The Journal of Immunology* 1994, **153**(7):3116-3122.

75. Bishop DK, Hinrichs DJ: **Adoptive transfer of immunity to Listeria monocytogenes. The influence of in vitro stimulation on lymphocyte subset requirements**. *The Journal of Immunology* 1987, **139**(6):2005-2009.

76. Wang ZE, Reiner SL, Hatam F, Heinzel FP, Bouvier J, Turck CW, Locksley RM: **Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-microglobulin-deficient**

mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 1993, **151**(4):2077-2086.

77. Conlan JW, Sjöstedt A, North RJ: **CD4+ and CD8+ T-cell-dependent and -independent host defense mechanisms can operate to control and resolve primary and secondary Francisella tularensis LVS infection in mice**. *Infection and Immunity* 1994, **62**(12):5603-5607.
78. Elkins KL, Cowley Siobhán C, Bosio Catharine M: **Innate and adaptive immune responses to an intracellular bacterium, Francisella tularensis live vaccine strain**. *Microbes and Infection* 2003, **5**(2):135-142.
79. Spriggs MK, Koller BH, Sato T, Morrissey PJ, Fanslow WC, Smithies O, Voice RF, Widmer MB, Maliszewski CR: **Beta 2-microglobulin-, CD8+ T-cell-deficient mice survive inoculation with high doses of vaccinia virus and exhibit altered IgG responses**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992, **89**(13):6070-6074.
80. Xu R, Johnson AJ, Liggitt D, Bevan MJ: **Cellular and Humoral Immunity against Vaccinia Virus Infection of Mice**. *The Journal of Immunology* 2004, **172**(10):6265-6271.
81. Geginat G, Schenk S, Skoberne M, Goebel W, Hof H: **A Novel Approach of Direct Ex Vivo Epitope Mapping Identifies Dominant and Subdominant CD4 and CD8 T Cell Epitopes from Listeria monocytogenes**. *The Journal of Immunology* 2001, **166**(3):1877-1884.
82. Li Z, Díaz-Montero CM, Valbuena G, Yu X-J, Olano JP, Feng H-M, Walker DH: **Identification of CD8 T-Lymphocyte Epitopes in OmpB of Rickettsia conorii**. *Infection and Immunity* 2003, **71**(7):3920-3926.
83. Hill A, Jugovic P, York I, Russ G, Bennink J, Yewdell J, Ploegh H, Johnson D: **Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity**. *Nature* 1995, **375**(6530):411-415.
84. Coffin J: **HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy**. *Science* 1995, **267**(5197):483-489.
85. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G-I, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F *et al*: **In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens**. *Immunity* 2002, **17**(2):211-220.
86. Bevan MJ: **Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay**. *The Journal of Experimental Medicine* 1976, **143**(5):1283-1288.
87. Ridge J P: **A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4^+ T - helper and a T - killer cell**. *Nature* 1998, **393**:474-478.
88. Rahemtulla A, Fung-Leung WP, Schilham MW, Kundig TM, Sambhara SR, Narendran A, Arabian A, Wakeham A, Paige CJ, Zinkernagel RM *et al*: **Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4**. *Nature* 1991, **353**(6340):180-184.
89. Ahmed R, Butler LD, Bhatti L: **T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses**. *Journal of Virology* 1988, **62**(6):2102-2106.
90. Guerder S, Matzinger P: **A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance**. *The Journal of Experimental Medicine* 1992, **176**(2):553-564.

91. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R: **CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection**. *Journal of Virology* 1994, **68**(12):8056-8063.

92. Sun JC, Bevan MJ: **Defective CD8 T Cell Memory Following Acute Infection Without CD4 T Cell Help**. *Science* 2003, **300**(5617):339-342.

93. Marzo AL, Vezys V, Klonowski KD, Lee SJ, Muralimohan G, Moore M, Tough DF, Lefrancois L: **Fully functional memory CD8 T cells in the absence of CD4 T cells**. *J Immunol* 2004, **173**(2):969-975.

94. Strasser A, Jost PJ, Nagata S: **The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System**, vol. 30. Cambridge, MA, ETATS-UNIS: Cell Press; 2009.

95. Metkar SS, Wang B, Aguilar-Santelises M, Raja SM, Uhlin-Hansen L, Podack E, Trapani JA, Froelich CJ: **Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation**. *Immunity* 2002, **16**(3):417-428.

96. Lieberman J: **The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal**. *Nature reviews Immunology* 2003, **3**(5):361-370.

97. Jiang X, Gregory SH, Wing EJ: **Immune CD8+ T lymphocytes lyse Listeria monocytogenes-infected hepatocytes by a classical MHC class I-restricted mechanism**. *The Journal of Immunology* 1997, **158**(1):287-293.

98. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat J-P, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR *et al*: **Differential Effects of Cytolytic T Cell Subsets on Intracellular Infection**. *Science* 1997, **276**(5319):1684-1687.

99. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melián An, Bogdan C *et al*: **An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells Mediated by Granulysin**. *Science* 1998, **282**(5386):121-125.

100. Smith LE, Rodrigues M, Russell DG: **The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and Leishmania-infected macrophages**. *J Exp Med* 1991, **174**(3):499-505.

101. Stenger S, Modlin RL: **Cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens**. *Curr Opin Immunol* 1998, **10**(4):471-477.

102. Salgame P, Abrams J, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin R, Bloom B: **Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones**. *Science* 1991, **254**(5029):279-282.

103. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV: **Intracellular Inactivation of the Hepatitis B Virus by Cytotoxic T Lymphocytes**. *Immunity* 1996, **4**(1):25-36.

104. White DW, Harty JT: **Perforin-Deficient CD8+ T Cells Provide Immunity to Listeria monocytogenes by a Mechanism That Is Independent of CD95 and IFN-γ but Requires TNF-α**. *The Journal of Immunology* 1998, **160**(2):898-905.

105. van Furth R, van Zwet TL, Buisman AM, van Dissel JT: **Anti-Tumor Necrosis Factor Antibodies Inhibit the Influx of Granulocytes and Monocytes into an Inflammatory Exudate and Enhance the Growth of Listeria monocytogenes in Various Organs**. *Journal of Infectious Diseases* 1994, **170**(1):234-237.

106. Hengel H, Flohr T, Hämmerling GJ, Koszinowski UH, Momburg F: **Human Cytomegalovirus Inhibits Peptide Translocation into the Endoplasmic Reticulum for MHC Class I Assembly**. *Journal of General Virology* 1996, **77**(9):2287-2296.

107. Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, Baltimore D: **The selective downregulation of class I major histocompatibility**

complex proteins by HIV-infected cells from NK cells, vol. 10. Cambridge, MA, ETATS-UNIS: Cell Press; 1999.

108. Orange JS, Biron CA: **Characterization of early IL-12, IFN-alphabeta, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection**. *The Journal of Immunology* 1996, **156**(12):4746-4756.
109. Monteiro JM, Harvey C, Trinchieri G: **Role of Interleukin-12 in Primary Influenza Virus Infection**. *Journal of Virology* 1998, **72**(6):4825-4831.
110. Nomura T, Kawamura I, Tsuchiya K, Kohda C, Baba H, Ito Y, Kimoto T, Watanabe I, Mitsuyama M: **Essential Role of Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 for Gamma Interferon Production Induced by Listeriolysin O in Mouse Spleen Cells**. *Infection and Immunity* 2002, **70**(3):1049-1055.
111. Dunn PL, North RJ: **Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis**. *Infection and Immunity* 1991, **59**(9):2892-2900.
112. Newman KC, Riley EM: **Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens**. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**(4):279-291.
113. Hanson BA: **Effect of immune serum on infectivity of Rickettsia tsutsugamushi**. *Infection and Immunity* 1983, **42**(1):341-349.
114. Seong SY, Kim HR, Huh MS, Park SG, Kang JS, Han TH, Choi MS, Chang WH, Kim IS: **Induction of neutralizing antibody in mice by immunization with recombinant 56 kDa protein of Orientia tsutsugamushi**. *Vaccine* 1997, **15**(16):1741-1747.
115. Ni YS, Chan TC, Chao CC, Richards AL, Dasch GA, Ching WM: **Protection against scrub typhus by a plasmid vaccine encoding the 56-KD outer membrane protein antigen gene**. *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**(5):936-941.
116. Clemens DL, Horwitz MA: **Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited**. *The Journal of Experimental Medicine* 1995, **181**(1):257-270.
117. MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD: **Immune Control of Tuberculosis by IFN-gamma-Inducible LRG-47**. *Science* 2003, **302**(5645):654-659.
118. DeLeo FR, Allen L-AH, Apicella M, Nauseef WM: **NADPH Oxidase Activation and Assembly During Phagocytosis**. *The Journal of Immunology* 1999, **163**(12):6732-6740.
119. Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT: **Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells**. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 1996, **271**(4):H1626-H1634.
120. Feng H-M, Walker DH: **Mechanisms of Intracellular Killing of Rickettsia conorii in Infected Human Endothelial Cells, Hepatocytes, and Macrophages**. *Infection and Immunity* 2000, **68**(12):6729-6736.
121. Endres R, Luz A, Schulze H, Neubauer H, Fütterer A, Holland SM, Wagner H, Pfeffer K: **Listeriosis in p47phox−/− and TRp55−/− Mice: Protection Despite Absence of ROI and Susceptibility Despite Presence of RNI**. *Immunity* 1997, **7**(3):419-432.
122. Beckerman KP, Rogers HW, Corbett JA, Schreiber RD, McDaniel ML, Unanue ER: **Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to Listeria monocytogenes**. *The Journal of Immunology* 1993, **150**(3):888-895.
123. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie Q-w, Sokol K, Hutchinson N *et al*: **Altered responses to bacterial infection**

and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995, **81**(4):641-650.

124. Herbst S, Schaible UE, Schneider BE: **Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis**. *PLoS One* 2011, **6**(5):e19105.
125. Walker DH, Popov VL, Crocquet-Valdes PA, Welsh CJ, Feng HM: **Cytokine-induced, nitric oxide-dependent, intracellular antirickettsial activity of mouse endothelial cells**. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1997, **76**(1):129-138.
126. Mittchel R, Cotran R: **Acute and chronic inflammation**. *Robbins Basic Pathology 7th edition, Philadelphia: Saunders* 2003:49-51.
127. Su CF, Yang FL, Chen HI: **Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates acute endotoxin-induced lung injury in rats**. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007, **34**(4):339-346.
128. Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ: **Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular Chlamydia psittaci replication in T24 cells**. *Infect Immun* 1986, **53**(2):347-351.
129. Carlin JM, Borden EC, Byrne GI: **Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits Chlamydia psittaci replication in human macrophages**. *J Interferon Res* 1989, **9**(3):329-337.
130. Pfefferkorn ER: **Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, **81**(3):908-912.
131. Pfefferkorn ER, Rebhun S, Eckel M: **Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts**, vol. 6. New York, NY, ETATS-UNIS: Liebert; 1986.
132. Schmitz JL, Carlin JM, Borden EC, Byrne GI: **Beta interferon inhibits Toxoplasma gondii growth in human monocyte-derived macrophages**. *Infection and Immunity* 1989, **57**(10):3254-3256.
133. Zelante T, Fallarino F, Bistoni F, Puccetti P, Romani L: **Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host**. *Microbes and Infection* 2009, **11**(1):133-141.
134. Rich KA, Burkett C, Webster P: **Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy**. *Cell Microbiol* 2003, **5**(7):455-468.
135. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V: **Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages**. *Cell* 2004, **119**(6):753-766.
136. Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K *et al*: **Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus**. *Science* 2004, **306**(5698):1037-1040.
137. Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C: **Escape of Intracellular Shigella from Autophagy**. *Science* 2005, **307**(5710):727-731.
138. Domingue GJ, Woody HB: **Bacterial persistence and expression of disease**. *Clinical Microbiology Reviews* 1997, **10**(2):320-344.
139. Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R: **Redefining Chronic Viral Infection**. *Cell* 2009, **138**(1):30-50.
140. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L: **A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System**. *Journal of Virology* 1998, **72**(11):8463-8471.

141. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen ISY, Hahn WC, Sharp PA *et al*: **Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells**. *RNA* 2003, **9**(4):493-501.

142. Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B: **A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis**. *Mol Ther* 2008, **16**(4):698-706.

143. Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R: **Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells**. *Nature* 1990, **344**(6268):742-746.

144. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR: **T cell receptor antagonist peptides induce positive selection**. *Cell* 1994, **76**(1):17-27.

145. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ: **Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench**. *Bioinformatics* 2009, **25**(9):1189-1191.

146. Sakuma M: **Probit analysis of preference data**. *Applied entomology and zoology* 1998, **33**(3):339-347.

147. Gesellschaft für Versuchstierkunde (Rüdiger Hack CK, Lutz Ruprecht, Heinz-Peter Scheuber, Renate Thiel, Heike Weinert, Jürgen Weiss), Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz (Cornelia Fritz): **Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren**. 2010.

148. Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Takahashi K, Oyanagi M: **Analysis of polypeptide composition and antigenic components of Rickettsia tsutsugamushi by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting**. *Infect Immun* 1985, **48**(3):671-675.

149. Chen HW, Zhang Z, Huber E, Chao CC, Wang H, Dasch GA, Ching WM: **Identification of Cross-Reactive Epitopes on the Conserved 47-Kilodalton Antigen of Orientia tsutsugamushi and Human Serine Protease**. *Infection and Immunity* 2009, **77**(6):2311-2319.

150. Ching WM, Wang H, Eamsila C, Kelly DJ, Dasch GA: **Expression and refolding of truncated recombinant major outer membrane protein antigen (r56) of Orientia tsutsugamushi and its use in enzyme-linked immunosorbent assays**. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998, **5**(4):519-526.

151. Stover CK, Marana DP, Carter JM, Roe BA, Mardis E, Oaks EV: **The 56-kilodalton major protein antigen of Rickettsia tsutsugamushi: molecular cloning and sequence analysis of the sta56 gene and precise identification of a strain-specific epitope**. *Infect Immun* 1990, **58**(7):2076-2084.

152. Walker DH, Mattern WD: **Rickettsial vasculitis**. *American heart journal* 1980, **100**(6 Pt 1):896-906.

153. Park JS, Jee YK, Lee KY, Kim KY, Myong NH, Seo PW: **Acute respiratory distress syndrome associated with scrub typhus: diffuse alveolar damage without pulmonary vasculitis**. *J Korean Med Sci* 2000, **15**(3):343-345.

154. Kim DM, Kim SW, Choi SH, Yun NR: **Clinical and laboratory findings associated with severe scrub typhus**. *BMC Infect Dis* 2010, **10**:108.

155. Bechah Y, Capo C, Grau GE, Raoult D, Mege J-L: **A murine model of infection with Rickettsia prowazekii: implications for pathogenesis of epidemic typhus**. *Microbes and Infection* 2007, **9**(7):898-906.

156. Walker DH, Popov VL, Feng H-M: **Establishment of a Novel Endothelial Target Mouse Model of a Typhus Group Rickettsiosis: Evidence for Critical Roles for Gamma Interferon and CD8 T Lymphocytes**. *Lab Invest* 2000, **80**(9):1361-1372.

157. Walker DH, Crawford CG, Cain BG: **Rickettsial infection of the pulmonary microcirculation: The basis for interstitial pneumonitis in Rocky Mountain spotted fever**. *Human Pathology* 1980, **11**(3):263-272.

158. Walsh DS, Myint KS, Kantipong P, Jongsakul K, Watt G: **Orientia tsutsugamushi in peripheral white blood cells of patients with acute scrub typhus**. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001, **65**(6):899-901.

159. Podsypanina K, Du Y-CN, Jechlinger M, Beverly LJ, Hambardzumyan D, Varmus H: **Seeding and Propagation of Untransformed Mouse Mammary Cells in the Lung**. *Science* 2008, **321**(5897):1841-1844.

160. Mackaness GB: **Cellular resistance to infection**. *The Journal of Experimental Medicine* 1962, **116**(3):381-406.

161. Dramsi S, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P, Cossart P: **Entry of Listeria monocytogenes into hepatocytes requires expression of InIB, a surface protein of the internalin multigene family**. *Molecular Microbiology* 1995, **16**(2):251-261.

162. Cho B-A, Ko Y, Kim Y-S, Kim S, Choi M-S, Kim I-S, Kim H-R, Cho N-H: **Phenotypic Characterization of Peripheral T Cells and Their Dynamics in Scrub Typhus Patients**. *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**(8):e1789.

163. Hamaguchi-Tsuru E, Nobumoto A, Hirose N, Kataoka S, Fujikawa-Adachi K, Furuya M, Tominaga A: **Development and functional analysis of eosinophils from murine embryonic stem cells**. *British Journal of Haematology* 2004, **124**(6):819-827.

164. Kataoka S, Konishi Y, Nishio Y, Fujikawa-Adachi K, Tominaga A: **Antitumor activity of eosinophils activated by IL-5 and eotaxin against hepatocellular carcinoma**, vol. 23. Larchmont, NY, ETATS-UNIS: Liebert; 2004.

165. Kaufmann SH, Hug E, De Libero G: **Listeria monocytogenes-reactive T lymphocyte clones with cytolytic activity against infected target cells**. *The Journal of Experimental Medicine* 1986, **164**(1):363-368.

166. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghrayeb J, Reimann KA, Walker CM: **Memory CD8+ T Cells Are Required for Protection from Persistent Hepatitis C Virus Infection**. *The Journal of Experimental Medicine* 2003, **197**(12):1645-1655.

167. Walker DH, Olano JP, Feng H-M: **Critical Role of Cytotoxic T Lymphocytes in Immune Clearance of Rickettsial Infection**. *Infection and Immunity* 2001, **69**(3):1841-1846.

168. Hackstadt T, Messer R, Cieplak W, Peacock MG: **Evidence for proteolytic cleavage of the 120-kilodalton outer membrane protein of rickettsiae: identification of an avirulent mutant deficient in processing**. *Infection and Immunity* 1992, **60**(1):159-165.

169. Trost M, Wehmhöner D, Kärst U, Dieterich G, Wehland J, Jänsch L: **Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic Listeria species**. *Proteomics* 2005, **5**(6):1544-1557.

170. Ohashi N, Tamura A, Ohta M, Hayashi K: **Purification and partial characterization of a type-specific antigen of Rickettsia tsutsugamushi**. *Infection and Immunity* 1989, **57**(5):1427-1431.

171. Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Takahashi K, Oyanagi M: **Analysis of polypeptide composition and antigenic components of Rickettsia tsutsugamushi by**

polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. *Infection and Immunity* 1985, **48**(3):671-675.

172. Vijh S, Pamer EG: **Immunodominant and subdominant CTL responses to Listeria monocytogenes infection**. *The Journal of Immunology* 1997, **158**(7):3366-3371.
173. Shen H, Miller JF, Fan X, Kolwyck D, Ahmed R, Harty JT: **Compartmentalization of Bacterial Antigens: Differential Effects on Priming of CD8 T Cells and Protective Immunity**. *Cell* 1998, **92**(4):535-545.
174. Bruder D, Darji A, Gakamsky DM, Chakraborty T, Pecht I, Wehland J, Weiss S: **Efficient induction of cytotoxic CD8+ T cells against exogenous proteins: establishment and characterization of a T cell line specific for the membrane protein ActA of Listeria monocytogenes**. *European Journal of Immunology* 1998, **28**(9):2630-2639.
175. Darji A, Bruder D, zur Lage S, Gerstel B, Chakraborty T, Wehland J, Weiss S: **The Role of the Bacterial Membrane Protein ActA in Immunity and Protection Against Listeria monocytogenes**. *The Journal of Immunology* 1998, **161**(5):2414-2420.
176. Seed JR: **Antigens and Antigenic Variability of the African Trypanosomes*†**. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 1974, **21**(5):639-646.
177. Dai WJ, Bartens W, Köhler G, Hufnagel M, Kopf M, Brombacher F: **Impaired macrophage listericidal and cytokine activities are responsible for the rapid death of Listeria monocytogenes-infected IFN-gamma receptor-deficient mice**. *The Journal of Immunology* 1997, **158**(11):5297-5304.
178. Maraskovsky E, Chen WF, Shortman K: **IL-2 and IFN-gamma are two necessary lymphokines in the development of cytolytic T cells**. *The Journal of Immunology* 1989, **143**(4):1210-1214.
179. Whitmire JK, Tan JT, Whitton JL: **Interferon-γ acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection**. *The Journal of Experimental Medicine* 2005, **201**(7):1053-1059.
180. Hussell T, Openshaw PJ: **Intracellular IFN-gamma expression in natural killer cells precedes lung CD8+ T cell recruitment during respiratory syncytial virus infection**. *Journal of General Virology* 1998, **79**(11):2593-2601.
181. Baumgarth N, Kelso A: **In vivo blockade of gamma interferon affects the influenza virus-induced humoral and the local cellular immune response in lung tissue**. *Journal of Virology* 1996, **70**(7):4411-4418.
182. James S, Glaven J, Goldenberg S, Meltzer M, Pearce E: **Tumour necrosis factor (TNF) as a mediator of macrophage helminthotoxic activity**. *Parasite Immunol* 1990, **12**(1):1-13.
183. Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M: **Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF-α and IFN-γ through a nitric oxide-dependent mechanism**. *Immunology Letters* 1992, **33**(1):35-40.
184. Feng HM, Popov VL, Walker DH: **Depletion of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in mice with Rickettsia conorii-infected endothelium: impairment of rickettsicidal nitric oxide production resulting in fatal, overwhelming rickettsial disease**. *Infection and Immunity* 1994, **62**(5):1952-1960.
185. Iwasaki H, Mizoguchi J, Takada N, Tai K, Ikegaya S, Ueda T: **Correlation between the concentrations of tumor necrosis factor-α and the severity of disease in**

patients infected with Orientia tsutsugamushi. *International Journal of Infectious Diseases* 2010, **14**(4):e328-e333.

186. Krömer G, Schauenstein K, Wick G: **Avian lymphokines: an improved method for chicken IL-2 production and assay. A con A-erythrocyte complex induces higher T cell proliferation and IL-2 production than does free mitogen**. *Journal of Immunological Methods* 1984, **73**(2):273-281.
187. Jerrells TR: **Immunosuppression associated with the development of chronic infections with Rickettsia tsutsugamushi: adherent suppressor cell activity and macrophage activation**. *Infection and Immunity* 1985, **50**(1):175-182.
188. Grisotto MG, D'Império Lima MR, Marinho CRF, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA, Alvarez JM: **Most parasite-specific CD8+ cells in Trypanosoma cruzi-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-αβ and CD8 molecules**. *Immunology* 2001, **102**(2):209-217.
189. Holler PD, Kranz DM: **Quantitative Analysis of the Contribution of TCR/pepMHC Affinity and CD8 to T Cell Activation**. *Immunity* 2003, **18**(2):255-264.
190. Xiao Z, Mescher MF, Jameson SC: **Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation**. *Journal of Experimental Medicine* 2007, **204**(11):2667-2677.
191. Fuller MJ, Zajac AJ: **Ablation of CD8 and CD4 T Cell Responses by High Viral Loads**. *The Journal of Immunology* 2003, **170**(1):477-486.
192. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R: **Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection**. *Nature* 2006, **439**(7077):682-687.
193. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJD, Suresh M, Altman JD, Ahmed R: **Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function**. *The Journal of Experimental Medicine* 1998, **188**(12):2205-2213.
194. Wherry EJ: **T cell exhaustion**. *Nat Immunol* 2011, **12**(6):492-499.
195. Geng P, Jerells TR: **The role of tumor necrosis factor in host defense against Scrub typhus rickettsiae. I: Inhibition of growth of Rickettsia tsutsugamushi, Karp strain, in cultured murine embryonic cells and macrophages by recombinant tumor necrosis factor-alpha**, vol. 38. Tokyo, JAPON: Wiley-Blackwell; 1994.
196. Prachason T, Konhan K, Pongnarin P, Chatsiricharoenkul S, Suputtamogkol Y, Limwongse C: **Activation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Patients with Scrub Typhus and its Role in Growth Restriction of *Orientia tsutsugamushi***. *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**(7).
197. Olken NM, Marletta MA: **NG-Methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase**. *Biochemistry* 1993, **32**(37):9677-9685.
198. Cady SG, Sono M: **1-methyl-dl-tryptophan, β-(3-benzofuranyl)-dl-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and β-[3-benzo(b)thienyl]-dl-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase**. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1991, **291**(2):326-333.
199. Blommaart EFC, Krause U, Schellens JPM, Vreeling-Sindelárová H, Meijer AJ: **The Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors Wortmannin and LY294002 Inhibit Autophagy in Isolated Rat Hepatocytes**. *European Journal of Biochemistry* 1997, **243**(1-2):240-246.

200. Fukuhara M, Fukazawa M, Tamura A, Nakamura T, Urakami H: **Survival of two Orientia tsutsugamushi bacterial strains that infect mouse macrophages with varying degrees of virulence**. *Microb Pathog* 2005, **39**(5-6):177-187.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Fleischer, zum einen für die Bereitstellung des Themas und ferner für die stets intensive und gewinnbringende Begleitung meiner Forschung.

Frau PD Dr. Minka Breloer danke ich für das stetige Interesse an dem Thema, die wertvollen Hinweise und die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Danken möchte ich Dr. Christian Keller für die Betreuung meiner Arbeit, die unermüdliche Unterstützung und hilfreichen Anregungen sowie die stets gute Zusammenarbeit und den konstruktiven Austausch.

Dr. Julia Kolbaum half mir durch viele wertvolle Hinweise und motivierende Worte weiter, wofür ich ihr sehr dankbar bin.

Mohammad Gharaibeh bin ich dankbar für die Hilfsbereitschaft, Verlässlichkeit und die angenehme gemeinsame Zeit im Labor.

Dr. Anke Osterloh und Stefanie Papp danke ich für die Herstellung der Vektoren LeGO-iC2-47 und LeGO-iC2-56.

Prof. Dr. Glatzel und Dr. Melanie Neumann danke ich für die erfolgreiche Kooperation bei der Histopathologie.

Dem Laborteam, insbesondere Ute Mehlhoop, danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die kompetente technische Unterstützung.

Jann Jacobsen danke ich für die engagierte Mitarbeit, insbesondere bei der Durchführung von qPCRs.

Schließlich danke ich meiner Familie, die mir geduldig Rückhalt gegeben hat.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 30.08.2012

_____