

Charakterisierung angeborener  
Immunmechanismen und  
immunpathologischer Effekte in der  
*Rickettsia typhi*-Infektion  
(Wolbach und Todd, 1920) in der Maus  
(*Mus musculus*, Linnaeus, 1758)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von  
**Stefanie Papp**

an der Fakultät für Mathematik, Informatik  
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg  
Fachbereich Biologie

Hamburg, Dezember 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Fleischer  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Immunologie

2. Gutachterin: PD Dr. Minka Breloer  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Helminthen-Immunologie

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, den 10.12.15

---

Stefanie Papp

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleischer möchte ich für die Möglichkeit danken in der Abteilung Immunologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin meine Doktorarbeit mit diesem interessanten Thema anfertigen zu dürfen, sowie für die kompetente Betreuung der Arbeit und die Begutachtung meiner Dissertation.

Frau PD Dr. Minka Breloer danke ich für die Bereitschaft, meine Doktorarbeit als Gutachterin zu lesen und zu bewerten.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anke Osterloh für die wissenschaftliche Betreuung, Diskussionsbereitschaft sowie Hilfestellung bei Vorträgen.

Ein großer Dank geht an die gesamte Laborgruppe Osterloh für die großartige Arbeitsatmosphäre.

Bei Yvonne Richter, Meryem Küçük und Arshad Ali bedanke ich mich für die kompetente und organisierte Pflege der Tiere und ihrer Hilfestellung.

Ein besonders lieber Gänseblümchen-Dank geht an Melanie Uhde, Ulricke Richardt und Kristin Moderzynski, die in den letzten Jahren nicht nur großartige Kollegen sondern auch enge unterstützende Freunde geworden sind.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Abteilung Immunologie für die freundliche Atmosphäre und den Spaß bei der Arbeit bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.1.1	NK-Zellen	1
1.1.1.2	Phagozyten	2
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	4
1.1.2.1	CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	5
1.2	Rickettsien	6
1.2.1	Taxonomie	6
1.2.2	Morphologie und Lebenszyklus von Rickettsien der Fleckfieber-Gruppe	7
1.2.2.1	Morphologie	7
1.2.2.2	Lebenszyklus	7
1.2.3	Endemisches und epidemisches Fleckfieber - Epidemiologie, Pathogenese und Diagnose	7
1.2.3.1	Epidemiologie	7
1.2.3.2	Pathogenese	8
1.2.3.3	Diagnose	9
1.3	Die Immunantwort gegen Rickettsien	10
1.4	Zielsetzung der Arbeit	12
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte	13
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Kits	14
2.1.2.1	Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.2.2	Kits	15
2.1.3	Lösungen und Puffer	16
2.1.4	Zelllinien	18
2.1.5	Plasmidvektoren	18
2.1.6	Primer	18
2.1.7	Antikörper	18
2.1.8	Verbrauchsmaterial	19
2.1.9	Tiere und Bakterien	20
2.1.10	Software	21

## Inhaltsverzeichnis

2.2	Methoden . . . . .	21
2.2.1	Zellbiologische Methoden . . . . .	21
2.2.1.1	Grundsätze der Zellkultur . . . . .	21
2.2.1.2	Kultivierung und Aufreinigung von <i>R. typhi</i> . . . . .	21
2.2.1.3	Präparation muriner Milzzellen . . . . .	22
2.2.1.4	Präparation muriner Leberzellen . . . . .	22
2.2.1.5	Präparation muriner peripherer Blutzellen . . . . .	23
2.2.1.6	Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl mit Trypanblau . . . . .	23
2.2.1.7	Generierung und Infektion von Knochenmarksmakrophagen . . . . .	23
2.2.1.8	Durchflusszytometrische Analyse von murinen Zellen . . . . .	24
2.2.1.9	Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) . . . . .	24
2.2.2	Biochemische Methoden . . . . .	25
2.2.2.1	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) . . . . .	25
2.2.2.2	Bestimmung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Werte (GPT) im Serum . . . . .	25
2.2.2.3	Bestimmung der Zytokinkonzentration im Plasma . . . . .	26
2.2.2.4	Detektion von Stickstoffmonoxid (NO) . . . . .	26
2.2.2.5	Detektion von <i>R. typhi</i> in der Immunfluoreszenz . . . . .	26
2.2.2.6	Histologische und immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten . . . . .	27
2.2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	28
2.2.3.1	DNS-Aufreinigung aus eukaryotischen Zellen und Geweben . . . . .	28
2.2.3.2	Detektion von <i>R. typhi</i> mittels <i>realtime</i> Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in eukaryotischen Zellen und Geweben . . . . .	28
2.2.4	Tierversuche . . . . .	29
2.2.4.1	Infektion von Mäusen und klinische Bewertung . . . . .	29
2.2.4.2	Blutentnahme . . . . .	29
2.2.4.3	Depletion von Neutrophilen . . . . .	30
2.2.5	Statistische Auswertung . . . . .	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1	Etablierung eines <i>R. typhi</i> -Infektionsmodells . . . . .	31
3.1.1	C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse scheinen resistent gegenüber einer <i>R. typhi</i> -Infektion zu sein . . . . .	32
3.1.1.1	Pathologie <i>R. typhi</i> -infizierter RAG1 KO Mäuse . . . . .	32
3.1.1.2	Immunantwort gegen <i>R. typhi</i> in C57BL/6 und RAG1 KO Mäusen . . . . .	33
3.1.1.2.1	C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse zeigen eine frühe systemische Zytokinantwort . . . . .	33
3.1.1.2.2	C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse zeigen einen frühen Anstieg von Monozyten/Makrophagen . . . . .	34
3.1.2	CB17 SCID Mäuse sind suszeptibel für die Infektion mit <i>R. typhi</i> . . . . .	36
3.1.2.1	Bestimmung der letalen Dosis in CB17 SCID Mäusen . . . . .	37

## Inhaltsverzeichnis

3.1.2.2	<i>R. typhi</i> -infizierte CB17 SCID Mäuse zeigen eine hohe Bakterienlast . . . . .	37
3.1.2.3	Pathologie <i>R. typhi</i> -infizierter BALB/c und CB17 SCID Mäuse . . . . .	38
3.1.2.3.1	<i>R. typhi</i> -infizierte CB17 SCID Mäuse entwickeln eine Splenomegalie . . . . .	38
3.1.2.3.2	<i>R. typhi</i> -infizierte CB17 SCID Mäuse entwickeln einen schweren Leberschaden . . . . .	39
3.2	Immunantwort gegen <i>R. typhi</i> in BALB/c und CB17 SCID Mäusen . . . . .	41
3.2.1	<i>R. typhi</i> -infizierte CB17 SCID Mäuse entwickeln eine starke systemische Inflammation . . . . .	41
3.2.2	Die Splenomegalie ist auf die Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen zurückzuführen . . . . .	42
3.2.3	Monozyten/Makrophagen und Neutrophile infiltrieren die Leber . . . . .	45
3.3	Funktionelle Charakterisierung von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen in CB17 SCID Mäusen . . . . .	46
3.3.1	Monozyten/Makrophagen und Neutrophile nehmen <i>R. typhi in vivo</i> auf . . . . .	47
3.3.2	Monozyten/Makrophagen und Neutrophile zeigen einen aktivierten Phänotyp . . . . .	48
3.3.3	Die Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen korreliert nicht mit der Phagozytose der Bakterien . . . . .	51
3.3.4	Makrophagen reagieren <i>in vitro</i> nicht auf eine <i>R. typhi</i> -Infektion . . . . .	52
3.4	Die Rolle von Neutrophilen in der <i>R. typhi</i> -Infektion in CB17 SCID Mäusen . . . . .	56
3.4.1	Neutrophile sind für den Leberschaden in CB17 SCID Mäusen verantwortlich . . . . .	57
3.4.2	Die Depletion der Neutrophilen in CB17 SCID Mäusen hat keinen Einfluss auf die Bakterienlast und den tödlichen Verlauf der Infektion . . . . .	59
3.4.3	Die Depletion von Neutrophilen hat keinen Einfluss auf die systemische Inflammation in CB17 SCID Mäusen . . . . .	61
3.4.4	Die Abwesenheit von Neutrophilen während der <i>R. typhi</i> -Infektion wird partiell durch die Expansion von Makrophagen kompensiert . . . . .	63
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>66</b>
4.1	RAG1 KO und CB17 SCID Mäuse als Modell für die Untersuchung der angeborenen Immunantwort gegen <i>R. typhi</i> . . . . .	66
4.1.1	In Mäusen des C57BL/6 Stammes können angeborene Immunmechanismen eine Infektion mit <i>R. typhi</i> über lange Zeit kontrollieren . . . . .	66
4.1.2	CB17 SCID Mäuse sind im Gegensatz zu RAG1 KO Mäusen hochsuszeptibel für die Infektion mit <i>R. typhi</i> . . . . .	69
4.1.3	Die unterschiedliche Suszeptibilität von Mäusen des BALB/c und C57BL/6 Stammes gegenüber <i>R. typhi</i> und die Rolle der Makrophagen . . . . .	71
4.2	Der Leberschaden in <i>R. typhi</i> -infizierten CB17 SCID Mäusen ist ein immunpathologischer Effekt infiltrierender Neutrophiler . . . . .	75
4.3	Ausblick . . . . .	78

*Inhaltsverzeichnis*

<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>Abstract</b>	<b>82</b>

# Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
bp	Basenpaare
BZR	B-Zellrezeptor
CpG-DNS	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zellen
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Factor	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht, forward scatter
G-CSF	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
HE	Hematoxylin-Eosin
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
i.v.	intravenös
IL	<i>Interleukin</i>
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IVC	<i>individually ventilated cages</i>
KIRs	Killerzellen-immunglobulinähnliche-Rezeptoren
KLRs	Killerzellen-lectinähnlichen Rezeptoren
LD100	Letale Infektionsdosis

## Abkürzungsverzeichnis

LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factori</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i>
MFI	Fluoreszenzintensität
MPO	Myeloperoxidase
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NK-kappa B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
ns	<i>nicht signifikant</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
R. typhi	<i>Rickettsia typhi</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SSC	Seitwärtsstreulicht, sideward scatter
TBS	Tris-buffered saline
Th Zellen	Helfer T-Zelle
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Taxonomische Unterteilung der Familie <i>Rickettsiaceae</i> . . . . .	6
3.1	Verlauf einer <i>R. typhi</i> -Infektion in Wildtyp C57BL/6 und immundefizienten RAG1 KO Mäusen. . . . .	32
3.2	C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse entwickeln keinen Leberschaden nach s.c. Infektion mit <i>R. typhi</i> . . . . .	33
3.3	RAG1 Mäuse zeigen eine nur leichte systemische Inflammation während der initialen Phase einer <i>R. typhi</i> -Infektion. . . . .	34
3.4	C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse zeigen eine tendenzielle Zunahme der Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen in der Milz. . . . .	35
3.5	Verlauf einer <i>R. typhi</i> -Infektion in Wildtyp BALB/c und B- und T-Zell-defizienten CB17 SCID Mäusen. . . . .	36
3.6	Titration der infektiösen Dosis in CB17 SCID Mäusen . . . . .	37
3.7	CB17 SCID Mäuse entwickeln eine hohe Bakterienlast infolge einer <i>R. typhi</i> -Infektion. . . . .	38
3.8	<i>R. typhi</i> -infizierte CB17 SCID Mäuse entwickeln eine Splenomegalie. . . . .	39
3.9	<i>R. typhi</i> -infizierte CB17 SCID Mäuse entwickeln einem schweren Leberschaden. . . . .	40
3.10	CB17 SCID Mäuse entwickeln eine starke systemische Inflammation während einer <i>R. typhi</i> -Infektion. . . . .	42
3.11	Die Entwicklung der Splenomegalie in CB17 SCID Mäusen wird durch eine Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen verursacht. . . . .	44
3.12	Die Leber von <i>R. typhi</i> -infizierten CB17 SCID Mäusen wird von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen infiltriert. . . . .	46
3.13	Makrophagen und Neutrophile in der Milz und Leber phagozytieren <i>R. typhi in vivo</i> . . . . .	48
3.14	Monozyten/Makrophagen und Neutrophile im Blut setzen ROS nach <i>R. typhi</i> -Infektion frei. . . . .	49
3.15	Monozyten/Makrophagen und Neutrophile in der Milz und Leber exprimieren iNOS nach <i>R. typhi</i> -Infektion. . . . .	50
3.16	Monozyten/Makrophagen und Neutrophile zeigen unabhängig von der bakteriellen Aufnahme einen aktivierten Phänotyp. . . . .	51
3.17	Bestimmung der Bakterienlast nach <i>in vitro</i> Infektion von Knochenmarksmakrophagen. . . . .	53
3.18	Makrophagen zeigen nach <i>in vitro</i> -Infektion mit <i>R. typhi</i> keinen aktivierten Phänotyp. . . . .	55
3.19	Die Depletion der Neutrophilen in CB17 SCID Mäusen nach <i>R. typhi</i> -Infektion. . . . .	57
3.20	Die Depletion der Neutrophilen verhindert die Entwicklung eines Leberschadens. . . . .	58

Abbildungsverzeichnis

3.21 Zelluläre Infiltrationen in der Leber <i>R. typhi</i> -infizierter Mäuse in der Abwesenheit von Neutrophilen. . . . .	59
3.22 Die Depletion der Neutrophilen hat keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und verhindert nicht den Tod von <i>R. typhi</i> -infizierten CB17 SCID Mäusen. . . . .	60
3.23 <i>R. typhi</i> -infizierte CB17 SCID Mäuse zeigten keine veränderte Bakterienlast nach Neutrophil-Depletion. . . . .	61
3.24 Die Depletion der Neutrophilen beeinflusst nicht die systemische Inflammation in CB17 SCID Mäusen. . . . .	62
3.25 Monozyten/Makrophagen kompensieren teilweise die Abwesenheit der Neutrophilen. . . . .	64
4.1 Hypothetische Funktion von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen in der Infektion von CB17 SCID Mäusen mit <i>R. typhi</i> . . . . .	77

# Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte . . . . .	13
2.2	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	14
2.3	Kits . . . . .	15
2.4	Lösungen und Puffer . . . . .	16
2.5	Eukaryotische Zellen . . . . .	18
2.6	Plasmidvektoren . . . . .	18
2.7	Primer . . . . .	18
2.8	Antikörper . . . . .	18
2.9	Verbrauchsmaterialien . . . . .	19
2.10	Mausstämme . . . . .	20
2.11	Bakterien . . . . .	20
2.12	Software . . . . .	21
2.13	Zykluseigenschaften . . . . .	28
2.14	Reaktionsansatz realtime PCR . . . . .	29

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem vermittelt den Schutz eines Organismus vor Infektionen mit verschiedenen Pathogenen wie Bakterien, Pilzen oder Viren, aber auch vor körperfremden Stoffen wie Toxinen. In höheren Vertebraten haben sich für die effiziente Bekämpfung von Erregern zwei mit einander wechselwirkende Systeme entwickelt: die angeborene und die adaptive Immunität. Bestandteile beider Systeme sind lymphatische Organe sowie spezialisierte zelluläre Komponenten und humorale Faktoren, welche die Effektormechanismen zum Schutz des Organismus vermitteln. Wesentliche Unterschiede zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem liegen evolutionsbiologisch in den Mechanismen und Rezeptoren der Pathogenerkennung.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die phylogenetisch ältere angeborene Immunität bildet die erste Barriere gegen eindringende Pathogene. Zu ihr gehören die Haut und Schleimhäute (Mukosa), das Komplementsystem sowie zelluläre Komponenten. Die Haut sowie die Schleimhäute des respiratorischen und des Verdauungstraktes vermitteln den ersten Schutz gegen eindringende Mikroorganismen. Neben der passiven Barrierefunktion produzieren die Epithelzellen der Schleimhäute Mukine, die auf deren Oberfläche zusätzlich einen Schutzfilm bilden. Die Funktion des Komplementsystems basiert auf 20 löslichen Proteinen, deren Aufgabe das Opsonieren und Töten von Mikroben sowie Rekrutieren von Phagozyten zum Ort der Infektion ist [1]. Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören natürliche Killerzellen (NK-Zellen) [2], Phagozyten wie Monozyten/Makrophagen [3] und Neutrophile Granulozyten [4] sowie dendritischen Zellen (DZ) [5]. Während NK Zellen infizierte Zellen direkt töten können, ist die Hauptaufgabe von Phagozyten die Identifizierung und anschließende Eliminierung von Mikroben.

#### 1.1.1.1 NK-Zellen

NK-Zellen sind Lymphozyten, die eine wichtige Funktion in der angeborenen Immunität bei der Eliminierung von intrazellulären Bakterien und Viren einnehmen. Sie entwickeln sich aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle im Knochenmark, aus denen auch B- und T-Zellen hervorgehen. In der Homöostase rezirkulieren sie durch Blut, Leber, Milz und sekundäre lymphoide Organe. Die Rekrutierung von NK-Zellen zum Ort einer Infektion oder Inflammation ist Chemokin-Rezeptor (CCR2, CCR5, CXCR3) vermittelt [6]. Ähnlich wie  $CD8^+$  T-Zellen können NK-Zellen infizierte Zellen direkt töten, z.B. durch die Freisetzung von Perforin und Granzym [7, 8]. Die Initiation der Eliminierung infizierter

## 1 Einleitung

Zellen durch NK-Zellen beruht auf einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen. NK-Zellen verfügen über inhibitorische Rezeptoren, die körpereigene Zellen identifizieren und die Reaktion gegen nicht infizierte Zellen blockieren. Ein Mechanismus dabei, ist die Erkennung einer normalen MHC I Expression der Zielzelle durch Killerzellen-lektinähnliche Rezeptoren (KLRs) und Killerzellen-immunglobulinähnliche-Rezeptoren (KIRs). Ist diese durch eine Infektion der Zielzelle herunterreguliert, erkennt die NK Zelle die veränderte Expression und wird aktiviert. Zusätzlich exprimieren NK-Zellen aktivatorische Rezeptoren wie NKG2D, der die Liganden *major histocompatibility complex class I-related chain A and B* (MICA/B) erkennt [9]. Diese zwei Stress-induzierten Liganden kommen auf z.B. Tumorzellen verstärkt vor. NKG2D erkennt außerdem *UL16 binding Protein 1 und 2* (*ULBP1,2*), ebenfalls MHC I-verwandte Proteine, die bei Stress sowie bei Infektionen in der Zelle heraufreguliert werden [10]. Die Erkennung dieser Moleküle trägt zusätzlich zu der Aktivierung von NK-Zellen bei. Nach Aktivierung setzen NK-Zellen den Inhalt zytotoxischer Granula, darunter Perforin und Granzym, in den interzellulären Raum frei [7, 8]. Diese Moleküle induzieren in der infizierten Zelle den programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose [11]. Darüber hinaus können NK-Zellen über von Makrophagen sekretierte Zytokine wie  $IFN\alpha$ ,  $IFN\beta$  und IL-12 aktiviert werden [12]. Aktivierte NK-Zellen setzen neben den zytotoxischen Granula außerdem  $IFN\gamma$  frei, das seinerseits die bakterizide Funktion von Makrophagen aktiviert.

### 1.1.1.2 Phagozyten

#### Neutrophile

Neutrophile bilden mit anderen Zellen des angeborenen Immunsystems die erste Barriere gegen eindringende Pathogene und sind wichtig für die frühe Eliminierung von Bakterien [13]. Sie gehen aus gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen hervor, aus denen sich auch Mastzellen, DZ und Makrophagen im Knochenmark entwickeln. Die Produktion und Differenzierung von Neutrophilen im Knochenmark wird durch den *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF) und *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) kontrolliert [14–16]. Neutrophile sind terminal differenzierte und in der Regel kurzlebige Zellen. Sie zirkulieren 12 bis 18 Stunden im Blut, bis sie entweder zum Ort einer Infektion rekrutiert werden oder in Apoptose gehen [17]. Die Halbwertszeit zirkulierender Neutrophiler kann jedoch bis auf 3,75 Tage und die von Gewebe-Neutrophilen sogar auf das 6 bis 16-fache bei einer Infektion ansteigen [18]. Aktivierte Gewebemakrophagen und Endothelzellen, aber auch Mastzellen, initiieren die Rekrutierung von Neutrophilen zum Ort der Infektion über die Freisetzung von Chemokinen und produzieren darüber hinaus Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6), *Tumor Necrosis Factor*  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ) und IL-1 sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [17, 19, 20]. Die Migration aus den Blutgefäßen in Gewebe zum Ort einer Infektion wird als Extravasation bezeichnet und erfolgt in vier Schritten: rollende Adhäsion, feste Bindung, Diapedese und Transmigration [19]. Die Phagozytose durch Neutrophile wird über Fc-, Mannose oder auch Komplementrezeptoren vermittelt [21]. Aufgenommene Pathogene befinden sich zunächst in der phagozytischen Vakuole, dem Phagosom, das weiter mit intrazellulären Vesikeln zum Phagolysosom verschmilzt. In diesem Kompartiment können Pathogene sowohl durch oxidative als auch nicht-oxidative Mechanismen eliminiert werden [13]. Sauerstoff-unabhängige Effektormoleküle befinden sich in verschiedenen Granula der Neutrophilen [17]. Von diesen werden die spezifischen Granula

## 1 Einleitung

(sekundäre Granula) und Gelatinase-haltigen Granula (tertiäre Granula) als erste sowohl ins Phagosom als auch extrazellulär freigesetzt. Beide enthalten antimikrobielle Proteine wie Laktoferrin, Lipocalin, Lysozym, Gelatinase und Metalloproteasen, die das Gewebe angreifen [22]. Schließlich werden auch die azurophilen Granula (primäre Granula) entlassen. Diese beinhalten antimikrobielle Peptide wie Defensine, antibiotische Proteasen wie Cathepsin G, Proteinase K und Elastase sowie Myeloperoxidase (MPO) [23]. MPO ist ein Enzym, das für die Beseitigung aufgenommener Mikroben besonders wichtig ist, da es maßgeblich an der Bildung ROS, insbesondere Hypochlorid, beteiligt ist [24]. Diese Verbindung ist das wirksamste bakterizide Oxidans in Neutrophilen [25]. Die Aktivierung von Neutrophilen über *Toll-like* Rezeptoren (TLR) fördert außerdem die Bildung von ROS, zu denen neben Hypochlorid und Hydroxylradikalen auch Wasserstoffperoxid, das durch Umwandlung von Superoxid durch das Enzym Superoxid-Dismutase entsteht, gehört. Dieser Prozess wird als respiratorische Entladung bezeichnet [26]. Hierbei kann ROS auch extrazellulär freigesetzt und das Gewebe geschädigt werden. Zusätzlich führt die Aktivierung von TLR auch zur Freisetzung von Zytokinen und steigert die Überlebensdauer von Neutrophilen [27]. Neben ROS bilden aktivierte Neutrophile auch reaktive Stickstoffverbindungen, hauptsächlich Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit, die ebenfalls antimikrobiell wirken. Schließlich können aktivierte Neutrophile DNS in Form von *neutrophil extracellular traps* (NETs) freisetzen, welche Pathogene binden können. Auch wenn Neutrophile essentiell für die Abwehr von Bakterien sind, so ist ihre Aktivierung mit einer Reihe von chronischen Erkrankungen und Gewebeschäden assoziiert [4, 17, 28–30]. Die durch die Degranulierung freigesetzten Faktoren können direkt Zellen wie Hepatozyten schädigen und dadurch Gewebeschäden verursachen.

### **Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen**

Monozyten und DZ gehen aus denselben gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen wie Granulozyten und Mastzellen hervor. Zytokine, die für die Differenzierung dieser Zellen essentiell sind, sind *Macrophage Colony Stimulating Factor* (M-CSF) und GM-CSF [14–16]. DZ residieren nach dem Verlassen des Knochenmarks vorrangig in nicht-hämatopoetischen Geweben wie der Haut, Mukosa und den Organen als unreife DZ. Als Antigenpräsentierende Zelle (APZ) nehmen sie Antigene (Ag) auf und migrieren nach Aufnahme als aktivierte DZ in die drainierenden Lymphknoten und differenzieren zu reifen DZ. Diese exprimieren verstärkt MHCII und kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 und agieren dort als APZ für T-Zellen. DZ nehmen daher eine essentielle Funktion bei der Initiation der adaptiven Immunantwort ein.

Im Gegensatz zu unreifen DZ zirkulieren Monozyten im Blut, migrieren in Gewebe und differenzieren dort zu Makrophagen. In den lymphatischen Organen, insbesondere der Milz, residiert eine große Zahl von Makrophagen, deren Hauptaufgabe die Eliminierung alternder Erythrozyten ist [31]. Neben Gewebemakrophagen der Haut existieren in bestimmten Organen Makrophagenpopulationen, die eine wichtige Funktion in der Immunantwort und Gewebemöostase haben. In der Leber werden diese residierenden Makrophagen als Kupfferzellen und im Gehirn als Mikroglia bezeichnet. Diese Zellen entwickeln sich aus embryonalen Vorläuferzellen im Dottersack [32–34] oder nach der Etablierung der Hämatopoese [35] und können außerdem unter bestimmten Bedingungen wie Infektionen proliferieren [36, 37].

Die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut zum Ort einer Inflammation oder Infektion wird u.a.

## 1 Einleitung

von (MCP-1) reguliert [38–40]. Im Gewebe differenzieren Monozyten weiter zu Makrophagen und phagozytieren eindringende Pathogene. Die Aktivierung von Phagozyten wie Monozyten/Makrophagen und auch DZ basiert vorrangig auf einer Reihe von konservierten und keimbahnkodierten Rezeptoren, die universelle Pathogen-assoziierte Strukturen (*pathogen-associated patterns*, PAMPs) erkennen. Diese Rezeptoren werden als Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) bezeichnet [41, 42]. Die unterschiedlichen Pathogene weisen verschiedene PAMPs auf. Zu diesen gehören oft für Mikroben essentielle Faktoren wie bspw. Lipopolysaccharide (LPS) als Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien oder unmethylierte Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Desoxyribonukleinsäuren (CpG-DNS) in Bakterien und Viren, die nicht in Säugerzellen vorkommen. Die Erkennung von PAMPs kann über verschiedene PRRs extra- oder intrazellulär erfolgen. Zu den am besten untersuchten PRRs gehört die Familie der TLRs. Die Bindung von PAMPs an diese Rezeptoren führt in Makrophagen und DZ über einen konservierten Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) [43], der im Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Freisetzung vieler Effektormoleküle induziert. Zu diesen gehören inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1, IL-12 und IL-6 und Chemokine sowie die Produktion bakterizider Substanzen wie NO und ROS. So induziert NF- $\kappa$ B die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-synthase (iNOS) in Makrophagen, welches wiederum die Konversion von Arginin zu Zitrullin katalysiert und in der Folge frei diffundierendes NO freigesetzt wird [44]. Innerhalb des Phagolysosoms trägt dies zu der Eliminierung der phagozytierten Bakterien bei, während in die Umgebung freigesetztes NO auch gegen extrazelluläre Pathogene wirksam sein kann [45]. Das Engagement von TLR induziert darüber hinaus die Bildung von ROS, die wie NO antibakteriell wirken. Die Produktion von ROS ist in Makrophagen jedoch geringer im Vergleich zu Neutrophilen [46]. Schließlich induziert NF- $\kappa$ B die Expression von kostimulatorischen Molekülen in Makrophagen und DZ und fördert auf diese Weise die antigenpräsentierende Funktion dieser APZ bei der Aktivierung von T-Zellen [47].

Die Phagozytose durch Makrophagen und DZ wird wie bei Neutrophilen über Fc-, Mannose- [48] oder auch Komplementrezeptoren [49] vermittelt. Anschließend erfolgt die Verschmelzung des Phagosoms mit intrazellulären Vesikeln, den Lysosomen, zu Phagolysosomen. Die Ansäuerung des Phagolysosoms ist bei Makrophagen stärker als in Neutrophilen und kann mit einem pH Wert von 4,0 das Wachstum von phagozytierten Pathogenen hemmen [50]. Der niedrige pH Wert fördert zudem die Aktivität von Lysozym, Glykosylasen, Phospholipasen und Nukleasen im Phagolysosom [51]. Die Aktivität dieser Enzyme führt folgend zu der Zerstörung des Pathogens.

### 1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zu der angeborenen Immunität ist die adaptive Immunität charakterisiert durch ihre Spezifität, Diversität und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses sowie Toleranz. T-Lymphozyten vermitteln dabei die zelluläre Immunantwort, während B-Lymphozyten durch die Produktion von AK die humorale Immunität ausbilden. B-Zellen wurden in der *Bursa fabricii* (B von *Bursa*) der Vögel entdeckt und erhielten daher ihre Bezeichnung, während T-Zellen im Thymus (T) differenzieren. Die Ag-spezifische Erkennung von Pathogenen durch B- und T-Zellen erfolgt über einen spezifischen Rezeptor, den B- bzw. T-Zellrezeptor (BZR bzw. TZR), der für jede Zelle einzigartig ist

## 1 Einleitung

[52]. Diese Rezeptorspezifität ist hoch divers und entsteht durch somatische Rekombination während der Reifung von B- und T-Zellen und ermöglicht die spezifische Erkennung einer Vielzahl von Ag [53]. T- Zellen werden in zwei Hauptpopulationen unterteilt: T-Helferzellen ( $CD4^+$  T-Zellen) und zytotoxische T-Zellen ( $CD8^+$  T-Zellen). Innerhalb von sechs Tagen nach Eindringen eines Pathogens wird eine effiziente adaptive Immunantwort initiiert. Die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses ermöglicht zudem nach erneutem Ag-Kontakt eine schnellere und effizientere Erkennung und Eliminierung eines bereits bekannten Pathogens [54].

### 1.1.2.1 $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen

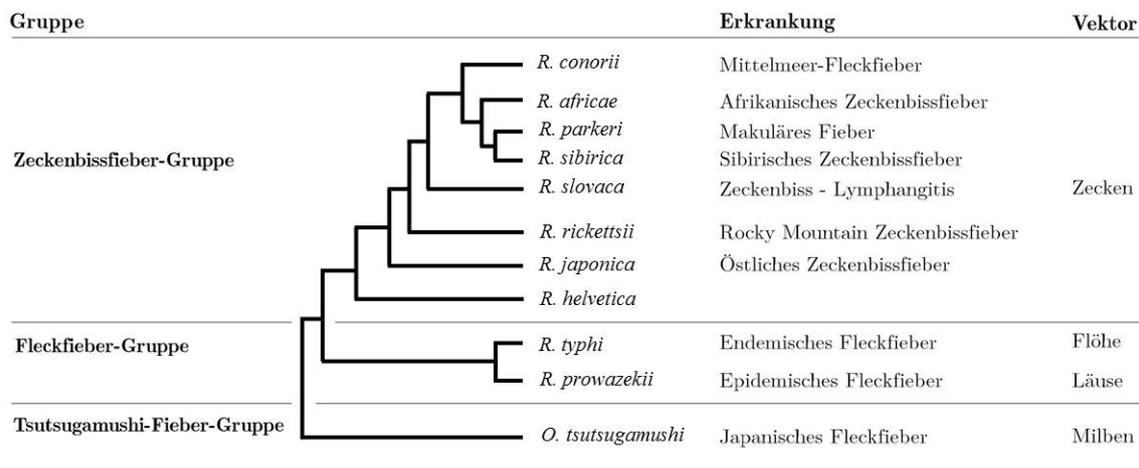
$CD8^+$  T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet und können infizierte Zellen direkt töten. Sie haben deshalb bei der Abwehr intrazellulärer Erreger eine besonders wichtige Funktion. Die Antigenerkennung durch  $CD8^+$  T-Zellen erfolgt Ag-spezifisch über den TZR, in Verbindung mit MHC I-Molekülen [55]. MHC I präsentiert Ag, die im Zytosol der infizierten Zielzelle abgebaut und über das endoplasmatische Reticulum in den MHC I-Präsentationsweg eingeschleust werden. Da nahezu alle kernhaltigen Zellen MHC I exprimieren, können  $CD8^+$  T-Zellen fast jede beliebige infizierte Zellen erkennen und eliminieren. Die Aktivierung von  $CD8^+$  T-Zellen ist daher streng reguliert und erfordert zusätzlich die Aktivierung durch Zytokine, die von  $CD4^+$  Helfer T-Zellen (Th Zellen) oder APZ freigesetzt werden. Für eine effiziente Aktivierung werden außerdem kostimulatorische Signale benötigt, die über eine Interaktion von CD80 und CD86 auf einer APZ mit CD28 auf der Oberfläche der T- Zelle interagieren.  $CD8^+$  T-Zellen verfügen über verschiedene Möglichkeiten, eine Zielzelle zu eliminieren. Einerseits produzieren  $CD8^+$  T-Zellen Zytokine wie  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$ , die indirekt zytotoxisch wirken. Zum anderen können sie durch die Bindung von Fas-Ligand auf ihrer Oberfläche an CD95 auf der Oberfläche der Zielzelle direkt Apoptose induzieren [56, 57]. Oder sie töten die Zielzelle auf gleiche Weise wie NK-Zellen durch Freisetzung von Perforin und Granzym in den interzellulären Raum und induzieren auf diese Weise die Apoptose der Zielzelle [58].

Die  $CD4^+$  Th-Zellen haben hauptsächlich Helferfunktion und beeinflussen über die Sekretion von Zytokinen die Polarisierung der Immunantwort und tragen so zur Eliminierung der Pathogene bei. Ihre Aktivierung basiert auf dem Kontakt mit einer APZ wie bspw. DZ oder Makrophagen. APZ nehmen extrazelluläre Ag aus ihrer Umgebung auf und prozessieren Peptidfragmente dieser Ag auf MHC II. Dieser Antigen-MHC II-Komplex wird von  $CD4^+$  T-Zellen über den TZR erkannt. Für die vollständige Aktivierung werden darüber hinaus die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Oberfläche der APZ benötigt, die mit CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen interagieren [59]. Zusammen induzieren TZR-vermittelte und kostimulatorische Signale nach Ag-Erkennung die Proliferation und klonale Expansion der Ag-spezifischen T-Zellen. Zusätzlich bestimmen Zytokine, die von der aktivierten APZ freigesetzt werden, die Differenzierung zu einer Th1- oder Th2-Zelle [59, 60]. Th1-Zellen sind durch die Freisetzung hoher Mengen  $IFN\gamma$  und geringer Mengen IL-4 gekennzeichnet.  $IFN\gamma$  aktiviert u.a. die bakterizide Funktion von Makrophagen und trägt so insbesondere zur Eliminierung von intrazellulären Erregern bei, die von diesen Zellen phagozytiert werden. Th2-Zellen setzen hingegen IL-4 und IL-13 und nur geringe Mengen von  $IFN\gamma$  frei. Diese Zytokine regen u.a. B-Zellen an, AK zu produzieren [59].

## 1.2 Rickettsien

### 1.2.1 Taxonomie

Rickettsien gehören zu der Familie der *Rickettsiaceae* und wurden nach dem amerikanischen Mikrobiologen Howard Taylor Ricketts benannt, der 1906 den Erreger des Rocky-Mountain-Fleckfiebers, *Rickettsia rickettsii* (*R. rickettsii*), beschrieb [61]. Rickettsien sind obligat intrazelluläre Bakterien, deren Vermehrungszyklus vom Eintritt und der Replikation im Zytoplasma eukaryotischer Wirtszellen abhängig ist [62]. Hierfür werden zelluläre Nährstoffe der Wirtszelle wie Glutamat, Aminosäuren und Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat benötigt [63]. Das natürliche Reservoir dieser parasitär lebenden Organismen sind verschiedene Säugetiere [64]. Als Vektoren dienen unterschiedliche Arthropoden wie Zecken, Läuse, Flöhe und Milben. Über 20 verschiedene Arten von Rickettsien sind derzeit beschrieben. Sie werden aufgrund serologischer und molekularbiologischer Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt: Zeckenbissfieber-Gruppe, Fleckfieber-Gruppe und Tsutsugamushi-Fieber-Gruppe (Abbildung 1.1). Die vornehmlich von Zecken übertragenen Zeckenbissfieber-Rickettsien sind die artenreichste Gruppe. Die bekanntesten Vertreter sind *R. rickettsii*, der Erreger des Rocky-Mountain-Zeckenbissfiebers, und *R. conorii*, der Erreger des Mittelmeer-Fleckfiebers. *Orientia tsutsugamushi* (*O. tsutsugamushi*) ist der Erreger des japanischen Fleckfiebers, das überwiegend in Südostasien auftritt. Aufgrund phänotypischer und genetischer Unterschiede wurde *O. tsutsugamushi* in die eigenständige Gattung *Orientia* eingegliedert und einer eigenen Gruppe (Tsutsugamushi-Fieber-Gruppe) zugeordnet [65]. Der Gruppe der Fleckfieber-Rickettsien gehören nur die beiden Erreger *R. typhi* (früher *R. mooseri*) und *R. prowazekii*, an. *R. typhi* ist der Erreger des endemischen und *R. prowazekii* der des epidemischen Fleckfiebers.



**Abbildung 1.1: Taxonomische Unterteilung der Familie *Rickettsiaceae*.** Aufgrund molekularbiologischer und phänotypischer Merkmale wird die Familie der *Rickettsiaceae* in drei verschiedene Gruppen taxonomisch unterteilt: Zeckenbissfieber-Gruppe, Fleckfieber-Gruppe und Tsutsugamushi-Fieber-Gruppe (modifiziert nach [66, 67])

### 1.2.2 Morphologie und Lebenszyklus von Rickettsien der Fleckfieber-Gruppe

#### 1.2.2.1 Morphologie

*R. typhi* wurde erstmals von *Wolbach und Todd* im Jahre 1920 in den Kapillaren, Arteriolen und Venen eines mexikanischen Patienten mit Fleckfieber beschrieben [68]. 1916 beschrieb Henrique da Rocha Lima am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg erstmalig *R. prowazekii* [69]. Der Erreger erhielt seinen Namen nach dessen Kollegen Stanislaus von Prowazek, der 1915 am epidemischen Fleckfieber verstarbt. Als Gram-negative Bakterien besitzen *R. prowazekii* und *R. typhi* LPS als Zellwandbestandteil [70–73]. Mit einer Größe von etwa 0,4 x 1,3 µm sind sie gegenüber anderen Bakterien vergleichsweise klein [74]. Darüber hinaus weisen sie ein sehr kleines Genom auf (*R. typhi*: 1.111.496 bp [75], *R. prowazekii*: 1.111.523 bp [76]), das zudem viele Pseudogene enthält. Das Genom von *R. typhi* umfasst insgesamt 877 Gene, welche für 838 Proteine codieren. Sequenzanalysen ergaben, dass *R. typhi*, *R. prowazekii* und *R. conorii* 775 Gene teilen. 24 Gene sind ausschließlich in *R. typhi* nachgewiesen.

#### 1.2.2.2 Lebenszyklus

Menschen [77] und Gleithörnchen (*Glaucomys volans volans*) sowie deren Ektoparasiten [78] sind die Hauptwirte von *R. prowazekii*. Die Infektion des Menschen mit *R. prowazekii* erfolgt über die Kleiderlaus (*Pediculus humanus humanus*) [77, 79]. *R. typhi* wird hingegen vornehmlich durch den Rattenfloh (*Xenopsylla cheopis*) übertragen [79, 80]. Generell beinhaltet der Lebenszyklus von *R. typhi* die Triade aus Ratte-Floh-Ratte [79]. Als Wildtierreservoir dienen aber auch Mäuse, Opossums und Stinktiere [81], während der Mensch ein Fehlwirt ist. Es wurde zudem eine Übertragung durch den Katzenfloh (*Ctenocephalides felis*) und den Mausfloh (*Leptopsyllia segnis*) gezeigt. Außerdem konnte *R. typhi* auch in Hunden nachgewiesen werden, was das Spektrum an möglichen Säugetierreservoirern vergrößert [64, 81]. Über eine Blutmahlzeit nimmt der Floh den Erreger aus einem infizierten Säugetierwirt auf. *R. typhi* repliziert folgend in Darmepithelzellen des Flohs, bis diese Zellen lysieren [81]. Die Infektion mit *R. typhi* hat jedoch keine negativen Auswirkungen auf die Vitalität oder die Reproduktivität des Flohs [64, 81]. Einmal infiziert, bleiben Flöhe Zeit ihres Lebens Überträger des Parasiten [82]. Darüber hinaus werden die Erreger transovariell an die nächste Flohgeneration übertragen [83]. Durch die Lyse der Darmepithelzellen wird *R. typhi* aus den Zellen in das Darmlumen freigesetzt und mit dem Kot ausgeschieden. Während einer Blutmahlzeit werden die im Kot befindlichen Bakterien durch Kratzen der Bissstelle auf den Wirt übertragen [84]. Eine Übertragung von *R. typhi* durch den Speichel der Flöhe ist ebenfalls möglich, aber nicht der Hauptinfektionsweg.

### 1.2.3 Endemisches und epidemisches Fleckfieber - Epidemiologie, Pathogenese und Diagnose

#### 1.2.3.1 Epidemiologie

Fleckfiebrickettsien sind weltweit verbreitete Parasiten. Infektionen des Menschen sind häufig mit schlechten hygienischen Bedingungen assoziiert, die zu einer Vermehrung der natürlichen Wirtstiere

## 1 Einleitung

und auch der übertragenden Vektoren beitragen. Große Ausbrüche von epidemischem Fleckfieber, das durch *R. prowazekii* ausgelöst wird, traten vornehmlich während des 1. Weltkrieges auf. Der jüngste größere Ausbruch war im Jahr 1995 und wurde in Burundi in Verbindung mit dem dortigen Bürgerkrieg beobachtet [85]. Heute tritt die Erkrankung sporadisch in ärmeren Ländern Südamerikas wie Peru [86] und Nordafrikas wie Algerien auf [87]. Darüber hinaus werden aber auch einzelne Fälle in Industrieländern wie Russland beobachtet [88].

Fälle von *R. typhi* ausgelöstem endemischem Fleckfieber werden dagegen weit häufiger auch in jüngerer Zeit beobachtet. Endemisches Fleckfieber ist weltweit verbreitet, allerdings mit einer unterschätzten Prävalenz, da diese Erkrankung aufgrund begrenzter diagnostischer Möglichkeiten häufig nicht erkannt wird. Endemische Gebiete sind hauptsächlich warme Küstenregionen mit einer hohen Rattenpopulation und niedrigen Hygienestandards [81, 89]. Das Auftreten von endemischem Fleckfieber lässt sich bis in die erste Hälfte des 20. Jahrhunderts zurückverfolgen. In der Periode von 1931 bis 1946 traten in den USA über 42.000 Fälle auf, wobei die Inzidenz danach rapide sank, hauptsächlich durch den Einsatz von Insektiziden und Rattengift [89, 90]. In Texas wurden dennoch in den Jahren 1980 bis 1987 etwa 350 Fälle von endemischem Fleckfieber diagnostiziert. In den letzten 15 Jahren wurden wieder vermehrt *R. typhi*-bedingte Erkrankungen dokumentiert. Nachweislich infizierten sich Menschen mit *R. typhi* bspw. auf Hawaii (47 Fälle, 2002) [91], in Tunesien (7 Fälle, 2005) [92], auf Zypern (21 Fälle, 2000 bis 2006) [93] und in Texas (33 Fälle, 2008) [94]. Darüber hinaus belegt eine kürzlich veröffentlichte Studie aus Kolumbien die bisher höchste Seroprävalenz von *R. typhi*, die in der aktuellen Literatur beschrieben wird [95]. Demnach wurden in 25,2 % der untersuchten Personen *R. typhi*-spezifische AK nachgewiesen. Zudem ließen sich in 28,7 % der Probanden kreuzreaktive IgG-AK gegen *R. typhi* und *R. felis* detektieren. Alle untersuchten Personen dieser Studie lebten in Kaffeeanbaugebieten in Zentralkolumbien. In den USA [96] und auch Europa [97] sind Obdachlose eine Personengruppe, die dieser Infektion durch Kontakt mit Mäusen und Ratten in hohem Maße ausgesetzt ist. Unter den Obdachlosen in Marseille wurde in den vergangenen 19 Jahren eine starke Zunahme der Seroprävalenz von *R. typhi* festgestellt [97]. Zwischen 2000 bis 2003 wurden nur 0,54 % dieser Menschen seropositiv für *R. typhi* getestet. Die Frequenz stieg jedoch in den Jahren von 2010 bis 2012 auf 22 % an. Diese Studie zeigt, dass *R. typhi* vermehrt auch in Europa vorkommt.

### 1.2.3.2 Pathogenese

Nach dem Eintritt in den Wirt infizieren Rickettsien zunächst vaskuläre Endothelzellen, als Hauptzielzellen, und vermehren sich in diesen [63, 98]. Daneben sind auch Fibroblasten, Makrophagen und dermale DZ mögliche Zielzellen in der Dermis [63, 79, 98]. Die Bakterien werden über nicht bekannte Mechanismen in die Zielzellen aufgenommen. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um Rezeptorvermittelte Endozytose oder Phagozytose handelt [63]. In den Zellen selbst entkommen Rickettsien aus dem frühen Endosom bzw. Phagosom, bevor es zu der Verschmelzung mit dem Lysosom kommt [99]. Zeckenbissfieber-Rickettsien sekretieren hierfür Phospholipase D und Hämolyysin C, welche die phagosomale Membran auflösen [100]. Auf diese Weise gelangen die Rickettsien innerhalb weniger Minuten in das Zytoplasma der Wirtszelle. Für *R. typhi* ist der Mechanismus noch nicht vollständig geklärt. Es konnte aber bereits ein homologes Gen für Hämolyysin, *tylC*, identifiziert werden. Das von diesem

## 1 Einleitung

Gen kodierte Protein besitzt hämolytische Aktivität [101]. Zudem exprimieren *R. typhi* und *R. prowazekii* das Enzym Phospholipase A2, das ebenfalls hämolytische Funktion besitzt und mit diesem Vorgang in Verbindung gebracht wird [102]. In der Zielzelle, insbesondere Endothelzellen, vermehren sich die Bakterien, bis die Zelle lysiert [64]. Auf diese Weise werden die Bakterien in die Umgebung freigesetzt und können nun benachbarte Endothelzellen oder, über den Blutstrom verteilt, auch weit entfernte Endothelzellen infizieren. Diese initiale lokale Lyse von kapillaren Blutgefäßen und die damit einhergehende Entzündungsreaktion führen zu dem charakteristischen makularen Hautausschlag, der hauptsächlich am Rumpf auftritt und namensgebend für die Fleckfieber-Erkrankungen war [103, 104]. In Folge der Lyse kommt es schließlich zu der Freisetzung der Erreger in hoher Zahl in den Blutkreislauf. Die Bakterien disseminieren auf diese Weise im Organismus und gelangen dadurch in verschiedene Organe wie Leber, Hirn, Lunge, Herz und Nieren [105].

Symptomatisch ähnelt das Krankheitsbild des endemischen dem des epidemischen Fleckfiebers. Nach einer Inkubationszeit von 6 bis 14 Tagen reagieren Patienten nach *R. typhi*-Infektion mit hohem langanhaltendem Fieber bis zu 41 °C. Weitere Symptome sind Schüttelfrost, starke Kopf- und Gliederschmerzen sowie Übelkeit. Oft genesen Patienten innerhalb von 15 Tagen auch ohne medikamentöse Behandlung. Es kann jedoch zu schweren Verläufen kommen, die durch multiple Organschäden charakterisiert sind und zum Tod des Patienten führen können [105]. Eine ausgedehnte Infektion der sinusoidalen Endothelzellen in der Leber und des Gefäßendothels in den Portalfeldern führt zur Schädigung angrenzender Hepatozyten und kann Leberfunktionsstörungen (Ikterus) verursachen [104, 106]. Weitere häufig beobachtete Erkrankungen sind Niereninsuffizienz, Pleuraerguss, Pneumonie und Herzfunktionsstörungen sowie neuronale Erkrankungen wie Enzephalitis, Krampfanfälle und Lethargie [84, 106, 107]. Der Verlauf einer Infektion mit *R. typhi* ist normalerweise im Vergleich zu einer *R. prowazekii*-Infektion milder. Die Letalität ist mit unter 5 % im Vergleich zu der einer *R. prowazekii*-Infektion (20-30 %) niedriger.

### 1.2.3.3 Diagnose

Bei einer rechtzeitigen Diagnose kann die Infektion mit *R. typhi* mit Antibiotika wie Doxycyclin oder Chloramphenicol behandelt werden. Ein zuverlässiger serologischer Nachweis ist jedoch erst nach 14 Tagen möglich. Das Standardverfahren beruht auf dem indirekten Nachweis von Antikörpern im Serum der Patienten mittels Immunfluoreszenz. Dieser Test erlaubt jedoch aufgrund der hohen Kreuzreaktivität der Antikörper zwischen den Rickettsien-Spezies keine differenzierte Diagnose. Weiteres diagnostisches Mittel ist die *realtime* PCR von Blut, Seren und Hautbiopsien. Die zuverlässigste Diagnose geben dabei Hautbiopsien der Eintrittsstelle [108, 109]. Da diese in der Mehrzahl der Patienten nicht zu erkennen sind, sind solche Proben jedoch äußerst selten verfügbar. Die rechtzeitige und differenzierte Diagnose der Erkrankung bleibt deshalb schwierig. Präventive Maßnahmen gegen die Infektion mit *R. typhi* in den Endemiegebieten sind bisher allein die Verbesserung der Hygienestandards sowie der Einsatz von Insektiziden und Nagetiergiften für die Bekämpfung der Rattenflöhe und ihrer Wirte. Ein Impfstoff wurde bislang nicht entwickelt.

### 1.3 Die Immunantwort gegen Rickettsien

Um die Immunantwort gegenüber Rickettsien zu untersuchen, wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Mausstämmen etabliert. Dabei zeigte sich, dass BALB/c und C57BL/6 Mäuse resistent gegenüber Infektionen mit Rickettsien sind [110–114]. Hingegen sind C3H/HeN Mäuse suszeptibel für diese Infektionen [110, 114]. Der überwiegende Teil der in der Literatur beschriebenen Studien zur Analysen der Immunantwort wurde mit Rickettsien der Zeckenbissfieber-Gruppe, vor allem *R. conorii* und *R. rickettsii*, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das von NK- und T-Zellen produzierte IFN $\gamma$  eine wichtige Funktion in der Eliminierung der Erreger hat. So führte die Infektion von IFN $\gamma$  KO Mäusen mit einer sublethalen Dosis von *R. conorii* sowie die Neutralisierung des Zytokins in infizierten C3H/HeN Mäusen zu einer schweren Erkrankung [115]. Insbesondere CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben zudem eine wichtige Funktion bei der Abwehr gegen diese intrazellulären Erreger aufgrund ihrer zytotoxischen Aktivität. Diese zeigte sich bspw. in der Abwehr von Zeckenbissfieber-Rickettsien in C3H/HeN Mäusen [116, 117]. Außerdem wiesen C57BL/6 Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *R. australis*, einem weiteren Erreger der Zeckenbissfieber-Gruppe, nach Depletion dieser Zellen auf [118].

Über die Infektion und die Immunantwort gegen Rickettsien der Fleckfieber-Gruppe ist hingegen noch sehr wenig bekannt. Die Etablierung eines Infektionsmodells für *R. prowazekii* ist schwierig, da sowohl Mäuse als auch Ratten entweder nach nur wenigen Stunden an der Infektion versterben oder aber überleben, jedoch folgend keine Krankheitssymptome zeigen [119]. In der aktuellen Literatur ist bisher nur die erfolgreiche Infektion von BALB/c Mäusen beschrieben [120]. Allerdings waren hier die Bakterien lediglich in den ersten 9 Tagen nach Infektion nachweisbar. Daher wurden Infektionsmodelle für *R. typhi* als Vertreter der Fleckfieber-Gruppe etabliert. Die Untersuchung der Infektion mit *R. typhi* erfolgte bisher in Meerschweinchen, Ratten und Mäusen. Eine der frühesten Analysen wurde von *Murphy et al.* in Meerschweinchen beschrieben [121, 122]. So führte die intradermale Inokulation mit *R. typhi* zunächst zu einer lokalen Replikation, bevor die Bakterien sich über drainierende Lymphknoten systemisch ausbreiteten. Obwohl *R. typhi* ab Tag 9 in Blut, Nieren und Milz nachweisbar war, entwickelten Meerschweinchen weder Krankheitssymptome noch war die Infektion tödlich. Ab Tag 8 setzte die Produktion von Antikörpern und damit die adaptive Immunantwort ein. *Aringo-Jaramillo et al.* studierten die Immunantwort gegen *R. typhi* in adulten und neugeborenen Ratten nach subkutaner (s.c.) und intradermaler Infektion [123]. Sowohl neugeborene als auch adulte Ratten wiesen eine Bakterienlast in verschiedenen Organen auf, jedoch entwickelten sie ebenfalls keine Erkrankung und überlebten die Infektion. Die Immunantwort gegen *R. typhi* wurde außerdem in resistenten Mäusen der Stämme BALB/c [124], C57BL/6 [111] und suszeptiblen C3H/HeN Mäusen [116] untersucht. Resistente s.c. infizierte BALB/c Mäuse zeigten eine systemische Infektion, die in der Milz ab Tag 7 nachweisbar war und an Tag 15 ihr Maximum erreichte [124]. Dennoch zeigten die Mäuse keine Symptome einer Erkrankung noch verlief die Infektion tödlich. Die Bildung von AK setzte, wie auch für Meerschweinchen beschrieben [121, 122], an Tag 9 nach Infektion ein. Ebenfalls resistente C57BL/6 Mäuse wiesen eine frühe NK Zell-Aktivierung sowie erhöhte IFN $\gamma$ -Konzentrationen im Serum nach intravenöser (i.v.) Infektion mit *R. typhi* auf [111]. Eine Bakterienlast war in den Milzen dieser Mäuse bis Tag 6 nicht nachweisbar. *Walker et al.* etablierten ein dosisabhängiges letales und nicht-letales Infektionsmodell in C3H/HeN Mäusen [116]. Die letale Infektion mit *R. typhi* führte in diesen Mäusen zu

## 1 Einleitung

einer höheren Bakterienlast in der Milz, der Lunge und im Gehirn sowie einer höheren AK-Antwort im Vergleich zu nicht-letal infizierten Mäusen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Studie zeigten zudem *R. typhi* im Zytoplasma von Endothelzellen der Alveolarkapillaren sowie Makrophagen in der Milz und in Kupfferzellen der Leber an Tag 2 nach Infektion. Der Erreger war außerdem in der Leber in Neutrophilen in Granulom-ähnlichen Läsionen nachweisbar.

Auch bei der Abwehr von *R. typhi* haben, wie für Rickettsien der Zeckenbissfieber-Gruppe gezeigt, T-Zellen eine wichtige Funktion. So führt die Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in C3H/HeN Mäusen zu einer erhöhten Bakterienlast und Pathologie [116]. Demnach scheinen T-Zellen, insbesondere CD8<sup>+</sup> T-Zellen, eine essentielle protektive Funktion bei der Abwehr dieser Erreger zu besitzen.

Über den Beitrag angeborener Immunmechanismen an der Bekämpfung und Pathologie während der Infektion mit Rickettsien ist sehr wenig bekannt. Für die Infektion mit *R. conorii* konnte eine wichtige Funktion von TLR4 bei der Abwehr nachgewiesen werden. So verläuft die Infektion von TLR4-defizienten C3H/HeN Mäusen mit einer subletalen Dosis von *R. conorii* im Gegensatz zu Wildtypmäusen letal [125]. Zudem wiesen diese Mäuse eine reduzierte IFN $\gamma$ -Produktion und damit auch eine verminderte Th1-Antwort auf. In der Infektion mit *R. conorii* ist TLR4 demnach für eine adäquate Aktivierung der APZ und damit effiziente Initiierung der adaptiven Immunantwort notwendig. Die Suszeptibilität der Mäuse ist demnach wahrscheinlich auf einen Mangel an IFN $\gamma$  und dessen protektiver Funktion zurückzuführen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TNF $\alpha$  eine wichtige Funktion in der Infektion mit *R. conorii* einnimmt [115]. So führte die Depletion dieses vornehmlich von Makrophagen produzierten Zytokins ebenfalls zu einer erhöhten Suszeptibilität und Letalität in C3H/HeN Mäusen. Auch wenn T-Zellen an der Abwehr von Rickettsien beteiligt sind, können B- und T-Zell-defiziente Mäuse wie RAG1 KO (C57BL/6) [126] und CB17 SCID (BALB/c) [127, 128] *R. conorii* auch in Abwesenheit adaptiver Immunmechanismen bekämpfen [129]. Sowohl RAG1 KO als auch CB17 SCID Mäuse überlebten die Infektion für mindestens 20 und 18 Tage. Eine Untersuchung der angeborenen Immunantwort in CB17 SCID und RAG1 KO Mäusen nach Infektion mit *R. typhi* ist in der gegenwärtigen Literatur noch nicht beschrieben. Es wird vermutete, dass insbesondere NK-Zellen bei der frühen Abwehr der Erreger von Bedeutung sind. So führte die Depletion von NK-Zellen in C3H/HeN Mäusen zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber *R. conorii* sowie von C57BL/6 Mäusen gegenüber *R. typhi* [111]. Auch Phagozyten haben eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Rickettsien. Bei der Bekämpfung durch Phagozyten scheint insbesondere die Induktion der iNOS-Expression und die Produktion von NO eine wichtige Funktion zu haben. So wurde für *R. conorii* *in vitro* gezeigt, dass Makrophagen durch iNOS-abhängige Mechanismen den Erreger bekämpfen [117, 130]. Außerdem beobachteten *Turco et al.*, dass die Freisetzung von NO *in vitro* die Fähigkeit von *R. prowazekii* inhibiert, Mausfibroblasten und Makrophagenzelllinien zu infizieren [131].

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

*R. typhi* ist ein humanpathogenes Bakterium, das im Menschen endemisches Fleckfieber verursacht. Bei einem schweren Verlauf kann die Erkrankung begleitet von ernstesten Symptomen zum Tod führen [84, 106]. In den letzten Jahren war eine Zunahme der Fallzahlen zu verzeichnen [91–94]. Zudem bleiben aufgrund fehlender rechtzeitiger und präziser diagnostischer Mittel Infektionen mit *R. typhi* oft unerkannt, weshalb die Prävalenz vermutlich höher liegt als dokumentiert. Trotzdem ist noch wenig über die Immunantwort gegen den Erreger bekannt. Nur einige wenige Tiermodelle sind für die Charakterisierung der Immunantwort bisher beschrieben [111, 116, 121–124]. Zu den untersuchten Mausstämmen zählen C3H/HeN, BALB/c und C57BL/6 Mäuse. Sowohl BALB/c als auch C57BL/6 Mäuse wurden als resistent gegenüber der Infektion mit *R. typhi* beschrieben. In der adaptiven Immunantwort scheinen T-Zellen, insbesondere CD8<sup>+</sup> T-Zellen, eine wichtige Funktion bei der Abwehr der Erreger zu haben. Dennoch ist speziell über die angeborene Immunantwort und die durch Makrophagen, Neutrophile und NK-Zellen vermittelten Effektormechanismen während der Infektion mit Rickettsien wenig bekannt. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit die angeborenen Immunmechanismen charakterisiert und auch immunpathologische Effekte in der *R. typhi*-Infektion in der Maus analysiert werden. Diese Untersuchungen sollten mit Hilfe von zwei unterschiedlichen B- und T-Zell-defizienten Mausstämmen, RAG1 KO (C57BL/6) und CB17 SCID (BALB/c), durchgeführt werden. Interessanterweise wurden diese beiden Mausstämme als resistent gegenüber der Infektion mit *R. conorii*, einem Erreger der Zeckenbissfieber-Gruppe beschrieben. Die Infektion der beiden Mausstämme mit *R. typhi* ist in der gegenwärtigen Literatur jedoch noch nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb RAG1 KO und CB17 SCID Mäuse vergleichend auch mit den jeweiligen Wildtypstämmen hinsichtlich Infektions- und Krankheitsverlauf nach Infektion mit *R. typhi* untersucht werden. Dabei sollten angeborene Immunreaktionen eingehend charakterisiert werden. Schließlich sollte die Depletion bestimmter Zellpopulationen Aufschluss darüber geben, ob und in welchem Maß das angeborene Immunsystem einen Schutz gegenüber einer *R. typhi* Infektion vermitteln kann oder zur Pathologie beiträgt.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav 6464L	Schlumbohm Medizintechnik, Hamburg
Bakterieninkubator Heraeus B12	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Bakterienschüttelinkubator TH30/SM30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERACELL 150	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERACELL 150i	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Durchflusszytometer Accuri™ C6	BD Bioscience, Heidelberg
Durchflusszytometer LSRII	BD Bioscience, Heidelberg
Elektronische Pipettierhilfe Accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Feinwaage Handy	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
Gamma-Bestrahlungsanlage OB 29/4	Steuerungstechnik Strahlentechnik GmbH, Braunschweig
Kühl- und Gefrieranlagen	Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
Mehrkanalpipetten	HTL Lab Solution, Warschau, Polen
<i>Microplate reader</i> Dynex MRXII	Dynex Technologies, Chantilly, USA
<i>Microplate washer</i> 405 LS	BioTek, Bad Friedrichshall
Mikroskop CKX41SF	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikroskop BZ9000	Keyence, Neu-Isenburg
Mikroskop Wilovert	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Walham, USA
pH-Meter pH211	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg Gilson International B.V., Limburg
Plattenschüttler MTS	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Präzisionswaage Ohaus CS200	Ohaus Corporation, Parsippany, USA

## 2 Materialien und Methoden

Präzisionswaage SI-2002	Denver Instrument GmbH, Göttingen
Precellys Homogenisator	Peqlab, Erlangen
Reflotron Plus	Roche, Mannheim
Rotor Gene 6000	Qiagen, Hilden
Sicherheitswerkbank SterilGard III Advanced	The Baker Company, Sanford, USA
Sicherheitswerkbank Berner Flow Safe 130	Berner International GmbH, Elmshorn
Thermomagnetrührer RET-GS	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Ventana Benchmark XT apparatus	Ventana, Tuscon, USA
Vortexmischer VF2	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad Alpha A	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zählkammer Neubauer (100 µm Tiefe und Kammerfaktor 10 <sup>4</sup> )	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1,0 R	Thermo Electron Corporation, Osterode
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Walham, USA
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Electro LED GmbH, Osterode

### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

#### 2.1.2.1 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2.2:** Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Lonza, Verviers, Belgien
Aceton	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cytofix/Cytoperm	BD Bioscience, Heidelberg
dH <sub>2</sub> O (Ampuwa)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dihydrorhodamin 123 (DHR)	AAT Bioquest, Californien, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DPBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Formalinlösung (37%)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gentamycin (10 mg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt

## 2 Materialien und Methoden

HEPES Buffered Saline (2 x)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IMDM	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
L929-Zellkulturüberstand (M-CSF)	BNI, Hamburg
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies GmbH, Eggenstein
LPS	Sigma-Aldrich, Seisenhofen
OneComp eBeads	eBioscience, Frankfurt
OptiPrep <i>Density Gradient Medium</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pferdeserum	Biochrom GmbH, Berlin
Permafluor	Thermo Fisher Scientific, Walham, USA
Perm/Wash Puffer	BD Bioscience, Heidelberg
RPMI-1640	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Salzsäure (25%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SYBR Green I nucleic acid gel stain	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tissue-Tek Medium	Sakura Finetek, Staufen
<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)</i>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ziegenserum	Dianova, Hamburg

---

### 2.1.2.2 Kits

**Tabelle 2.3:** Kits

Name	Hersteller
IL-6 DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development Kit	R&D Systems, Wiesbaden
IL-12 DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development Kit (nur Standard 100ng/ml)	R&D Systems, Wiesbaden
TNFα DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development Kit	R&D Systems, Wiesbaden
QIAamp DNA Mini Kit (# 51306)	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN HotStarTaq DNA Polymerase	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>LEGENDplex mouse inflammation panel</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
Reflotron GPT	Roche, Mannheim
Precellys Keramik Kit Tubes	Peqlab, Erlangen
<i>ultraview universal DAB detection kit</i>	Ventana, Tuscon, USA

---

## 2.1.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.4: Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
20 x PBS	2,7 M NaCl 54 mM KCl 87 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x ddH <sub>2</sub> O 30 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
4 % Formalinlösung	PBS 4 % (v/v) Formalin
Blockpuffer ELISA	PBS 1 % BSA
Coating-Puffer ELISA	28,5 % (v/v) 1 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 71,5 % (v/v) 20 mM NaHCO <sub>3</sub> pH 9,6
Einfriermedium	FCS 7,5 % (v/v) DMSO
Erythrozyten-Lysepuffer	10 % (v/v) 0,1 M TRIS (pH 7,5) 90 % (v/v) 155 mM NH <sub>4</sub> Cl
FACS-Puffer	PBS 1 % (v/v) FCS 0,1 % (w/v) NaN <sub>3</sub>
Griß 1 Lösung	1 M HCL 1,0 % (v/v) Sulfonamid
Griß 2 Lösung	H <sub>2</sub> O 0,3 % (v/v) Naphtylethylendiamin-Dihydrochlorid
Lösung Immunhistochemie	TBS (pH 7,6)

## 2 Materialien und Methoden

	5 % (v/v) Ziegen Serum 0,1 % (v/v) Triton X-100
Standard NO	1 M NaNO <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O
Substrat	Substratpuffer 1,7 % (v/v) TMB-Lösung 1,2 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Substratpuffer	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,5
TBS pH 7,6	H <sub>2</sub> O 2,42 % (v/v) Tris 8,0 % (v/v) NaCl
TMB-Lösung	DMSO 0,6 % TMB
Waschlösung ELISA	PBS 0,05 % Tween <sup>®</sup> 20
Zellkulturmedium (Kultur von L929)	88,1 % (v/v) RPMI-1640 8,8 % (v/v) FCS 1,8 % (v/v) L-Glutamin 0,9 % (v/v) HEPES Buffered Saline 0,4 % (v/v) Gentamycin
Zellkulturmedium ( <i>R. typhi</i> Kultur in L929)	88,1 % (v/v) RPMI-1640 8,8 % (v/v) FCS 1,8 % (v/v) L-Glutamin 0,9 % (v/v) HEPES Buffered Saline
Zellkulturmedium (Kultur von Knochenmarksmakrophagen)	77,8 % (v/v) IMDM 6,5 % (v/v) FCS 0,7 % (v/v) L-Glutamin 5 % (v/v) Pferdeserum 10 % (v/v) L929-Zellkulturüberstand (MCS-F)

---

### 2.1.4 Zelllinien

**Tabelle 2.5:** Eukaryotische Zellen

Name	Organismus	Beschreibung
L929	Maus (C3H/An) ( <i>Mus musculus</i> )	adhärent wachsende Fibroblasten-ähnliche Zelllinie (ATCC Nr. CCL1)

### 2.1.5 Plasmidvektoren

**Tabelle 2.6:** Plasmidvektoren

Bezeichnung	Größe	Hersteller
pCR2.1- <i>PrsA</i> #4	4068 bp	BNI, Hamburg

### 2.1.6 Primer

**Tabelle 2.7:** Primer

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
<i>PrsA</i> -Forward	5'-ACA GCT TCA AAT GGT GGG GT-3'	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>PrsA</i> -Reverse	5'-TGC CAG CCG AAA TCT GTT TTG-3'	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

### 2.1.7 Antikörper

**Tabelle 2.8:** Antikörper

Bezeichnung	Klon	Verdünnung/Menge	Hersteller
anti-Hase Histofine Simple Stain Mouse MAX Peroxidase	-	1 Tropfen	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
anti-Ratte Histofine Simple Stain Mouse MAX Peroxidase	-	1 Tropfen	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
antiMaus Histofine Simple Stain Mouse MAX Peroxidase	-	1 Tropfen	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
Hase anti-IBA1	-	1:500	WAKO, Neuss
Hase anti-iNOS	-	1:75	Abcam, Cambridge, USA

## 2 Materialien und Methoden

Maus anti- <i>R.typhi</i>	BNITM52	1:100	BNITM, Hamburg
Maus anti- <i>R.typhi</i> Überstand (16.05.15)	BNITM52	unverdünnt	BNITM, Hamburg
Maus IgG3 unmarkiert	B10	1:1000	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ratte anti-CD80 PE/Dazzle 594	12-10A1	1:100	BioLegend, London, UK
Ratte anti-CD11b PE	M1/70	1:160	eBioscience, Frankfurt
Ratte anti-CD11b-PerCP-Cy5.5	M1/70	1:200	BD Biosciense, Heidelberg
Ratte anti-GR1- (Ly-6C/Ly-6G) APC	RB6-8C5	1:500	BioLegend, London, UK
Ratte anti-IL-12 (p40/p70)	-	1:167	BD Biosciense, Heidelberg
Ratte anti-IL-12 (p40/p70) Biotin	-	1:1250	BD Biosciense, Heidelberg
Ratte anti-Ly-6C-PerCP-Cy5.5	HK1.4	1:200	BioLegend, London, UK
Ratte anti-Ly-6G-APC	1A8	1:166,7	BioLegend, London, UK
Ratte anti-Ly-6G	1A8	1:1000	BD Biosciense, Heidelberg
Ratte anti-Ly-6G (Depletion)	1A8	200 µg	BioXCell, New Hampshire, USA
Ziege anti-Maus IgG3-FITC	B10	1:200	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ratte anti-MHCI (H-2d)-PE	SF1-1.1.1	1:200	eBioscience, Frankfurt
Ratte anti-NOS2-PE	CXNFT	1:200	eBioscience, Frankfurt
Ratte anti-NOS2 PE/Cy7	CXNFT	1:300	eBioscience, Frankfurt
Ratte IgG1 $\kappa$ Isotyp PE/Cy7	RTK2071	1:300	BioLegend, London, UK
Ratte IgG1 $\kappa$ Isotyp PE/Dazzle 594	RTK 2071	1:100	BioLegend, London, UK
Ratte IgG2a $\kappa$ Isotyp (Depletion)	2A3	200 µg	BioXCell, New Hampshire, USA
Ratte IgG2a $\kappa$ Isotyp PE	RTK2758	1:200	BioLegend, London, UK
anti-FITC-AlexaFlour488	CL148- 1E4	1:1000	Jackson ImmunoResearch Inc., West Baltimore, USA

### 2.1.8 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 2.9:** Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Accu-Check Softclix Lanzetten	Roche, Mannheim
Einmalspritzen Injekt <sup>®</sup> (2, 5 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
ELISA-Platten (96-Loch)	greiner bio-one, Frickenhausen
EDTA-Röhrchen	KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth
Deckgläschen	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Eckermünde
Gewebekulturflaschen (75 und 175 cm <sup>2</sup> )	greiner bio-one, Frickenhausen

## 2 Materialien und Methoden

Gewebekulturplatten (6-, 24- und 96-Loch)	greiner bio-one, Frickenhausen
Glasflaschen (500 ml, 1 l und 2 l)	Schott AG, Mainz
Glasküvette	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Glaspipetten	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kryoröhrchen	greiner bio-one, Frickenhausen
Objekträger (12-Loch, maskiert)	Thermo Fisher Scientific, Walham, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µl	greiner bio-one, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Reaktionsgefäß (15 und 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<i>Safe-Lock</i> Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
<i>SafeSeal</i> Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritzenfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<i>Strip Tubes and Caps</i> 0,1 ml	Qiagen, Hilden
Zellschaber (16 und 39 cm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellsieb (Nylon, 70 µm)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA

### 2.1.9 Tiere und Bakterien

**Tabelle 2.10:** Mausstämme

Bezeichnung	Herkunft
<i>Mus musculus</i> BALB/c	BNITM, Hamburg
<i>Mus musculus</i> C57BL/6	BNITM, Hamburg
<i>Mus musculus</i> CB17 SCID (CB17/lcr-PrkdcSCID/lcrIcoCrI)	BNITM, Hamburg
<i>Mus musculus</i> RAG1 KO	BNITM, Hamburg

**Tabelle 2.11:** Bakterien

Bezeichnung	Herkunft
<i>R. typhi</i> (Stamm Wilmington)	BNITM, Hamburg

### 2.1.10 Software

Tabelle 2.12: Software

Software	Hersteller
BioLegend <i>LEGENplex</i> Software	BioLegend, London, UK
FlowJo 10.0.5	Tree Star, Inc., Ashland, USA
GraphPrism 5.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Keyence Mikroskop Software	Keyence, Neu-Isenburg
NanoDrop 2000/2000c Software	Thermo Fisher Scientific, Walham, USA
Revelation Software	Dynex Technologies, Chantilly, USA
Rotor-Gene 600 Series Software	Qiagen, Hilden

## 2.2 Methoden

### Grundsätze im Arbeiten mit einem Erreger der Sicherheitsstufe 3

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit dem humanpathogenen Erreger *R. typhi* wurden in einem Sicherheitslabor der Stufe 3 und unter der sterilen Atmosphäre einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Genehmigt wurden die Experimente von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Amt für Verbraucherschutz, Hamburg.

#### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

##### 2.2.1.1 Grundsätze der Zellkultur

Die Durchführung aller Zellkulturarbeiten erfolgte in der sterilen Atmosphäre einer Sicherheitswerkbank. Für die Arbeiten wurden sterile Glaswaren und Lösungen sowie Einmalplastikwaren verwendet. Die Sterilisation der Materialien und Geräte erfolgte im Autoklaven für 20 min bei 135 °C und 2 bar. Die Kultivierung der Zellen wurde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

##### 2.2.1.2 Kultivierung und Aufreinigung von *R. typhi*

In allen durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Experimenten wurde der Stamm *R. typhi* Wilmington verwendet. *R. typhi* ist ein obligat intrazelluläres Bakterium. Aus diesem Grund wurden die Bakterien in adhärent wachsenden L929 Zellen kultiviert und aus diesen ein Bestand gereinigter Bakterien hergestellt, der bei -196 °C in flüssigem Stickstoff bis zu seiner Verwendung gelagert wurde.

#### Kultivierung

Für die Kultivierung wurden L929 Zellen geerntet und bei 1966 rad (560 sek) in einer Gamma-Bestrahlungsanlage (OB 29/4) bestrahlt. Je 4x10<sup>6</sup> Zellen wurden anschließend in 15 ml Zellkulturmedium in eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) eingesät und über Nacht kultiviert, um eine Adhärenz

der Zellen zu erreichen. Die Infektion der Zellen erfolgte aus einer infizierten Kultur der Vorwoche. Je nach Infektionsstatus wurden hierfür aus dieser 1 bis 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension geerntet und in eine Zellkulturflasche mit bestrahlten L929 Zellen überführt. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen für weitere 6 Tage kultiviert. Die Überprüfung der Infektion erfolgte mittels *realtime* PCR oder in der Immunfluoreszenz.

### Aufreinigung

Für die Herstellung eines Bakterienbestands für *in vitro* und *in vivo* Infektionsexperimente wurde *R. typhi* aus L929 Zellen aufgereinigt. Hierfür wurden bis zu 20 große Zellkulturflaschen ( $175\text{ cm}^2$ ) verwendet. Am Tag vor der Infektion erfolgte die Bestrahlung der Zellen und im Anschluss das Ausplattieren von je  $1 \times 10^7$  Zellen in 30 ml Zellkulturmedium pro Zellkulturflasche. Die Infektion wurde je nach Infektionsstatus mit 1 bis 10  $\mu\text{l}$  Inokulat der Kultur der Vorwoche durchgeführt. Nach 4 bis 7 Tagen erfolgte die Aufreinigung der Bakterien aus den Zellen. Hierfür wurden die Zellen im Medium geerntet und die Zellsuspension in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und die Zellen bei  $161 \times g$  für 5 min pelletiert. Pro  $1 \times 10^7$  geerntete Zellen wurden diese in 1,5 ml Medium aufgenommen und die Suspension in 2 ml *Safe-Lock* Reaktionsgefäße mit 200  $\mu\text{l}$  Kies überführt. Das Gemisch wurde folgend für 1 min sorgfältig gevortext und das Zelllysat über einen Spritzenfilter in ein 50 ml Reaktionsgefäß transferiert, um die Bakterien von zerstörten Zellbestandteilen zu trennen. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde auf 40 ml Medium aufgefüllt, mit 40 ml kaltem ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) Einfriermedium versetzt und je 1 ml in vorgefrorene ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) Cryo-Röhrchen überführt. Für die dauerhafte Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff erfolgte zunächst die Lagerung in der Dampfphase für 24 Stunden. Die Konzentration von *R. typhi*-Partikeln pro Röhrchen wurde mittels *realtime* PCR bestimmt.

#### 2.2.1.3 Präparation muriner Milzzellen

Für die Präparation muriner Milzzellen wurden Milzen steril entnommen, das Gewicht bestimmt und anschließend in eine Petrischale mit 10 ml PBS überführt. Das Homogenisieren der Milz erfolgte mit dem Stempel einer 5 ml Einmalspritze. Die Zellsuspension wurde anschließend über ein  $70\text{ }\mu\text{m}$  Zellsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß transferiert und die Petrischale mit 10 ml PBS gespült um eine maximale Ausbeute an Milzzellen zu erhalten. Im nächsten Schritt wurde die Suspension bei  $161 \times g$  pelletiert und eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt. Hierfür erfolgte die Inkubation der Zellen zweimal in 5 ml Erythrozytenlysepuffer für je 5 min bei Raumtemperatur (RT). Die Reaktion wurde jeweils mit 10 ml FACS-Puffer gestoppt, die Zellen am Ende zweimal mit je 20 ml FACS-Puffer gewaschen und die Zellzahl bestimmt.

#### 2.2.1.4 Präparation muriner Leberzellen

Für die Herstellung einer Leberzellsuspension wurde das Organ zunächst durch Injektion von 5 ml PBS in die *Vena cava* bei gleichzeitiger Eröffnung der *Vena portae* perfundiert. Anschließend wurde die Gallenblase entfernt, die Leber präpariert und das Organgewicht bestimmt. Das Homogenisieren des Organs erfolgte mit Hilfe eines Stempels einer 2 ml Einmalspritze in einem  $70\text{ }\mu\text{m}$  Zellsieb. Die Leber

## 2 Materialien und Methoden

wurde über das Sieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß zerrieben und anschließend in 50 ml PBS resuspendiert. Um die Hepatozyten aus der Suspension zu entfernen, erfolgte eine zweimalige Zentrifugation für je 4 min bei 35,8 x g. Der Überstand wurde anschließend für 7 min bei 503 x g zentrifugiert und das Zellpellet für die Dichtezentrifugation in 4,5 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde mit 2,5 ml OptiPrep *Density Gradient Medium* gemischt, anschließend mit 1,5 ml PBS überschichtet und bei 400 x g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Mononukleäre Zellen aus der Intermediärphase wurden abgenommen und mit 20 ml PBS für 5 min bei 503 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 5 ml Erythrozytenlysepuffer und Inkubation bei RT für 5 min. Die Reaktion wurde mit 10 ml FACS-Puffer abgestoppt, die Zellen zweimal mit 20 ml FACS-Puffer gewaschen und abschließend die Zellzahl bestimmt.

### 2.2.1.5 Präparation muriner peripherer Blutzellen

Um periphere Blutzellen zu erhalten, erfolgte die Blutabnahme submandibulär oder durch Punktion des Herzens. Das Blut wurde sofort in EDTA-beschichtete Röhrchen überführt, um eine Hämagglutination zu verhindern. 30 µl EDTA-Blut wurden anschließend in ein Polypropylenröhrchen überführt, zweimal mit je 1 ml Erylyse-Puffer 5 min bei RT inkubiert und die Reaktion mit 2 ml FACS-Puffer abgestoppt. Vor der Färbung für durchflusszytometrische Analysen erfolgte ein zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer.

### 2.2.1.6 Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl mit Trypanblau

Die Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl erfolgte unter Verwendung von Trypanblau in einer Neubauerzählkammer. 90 µl einer Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau versetzt. Dieser Farbstoff dringt in geschädigte oder apoptotische Zellen ein und färbt diese blau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop farblos und wurden gezählt. Die Bestimmung der Lebendzellzahl pro Milliliter errechnete sich durch Multiplikation der gezählten Zellen, dem Kammerfaktor und dem Verdünnungsfaktor.

### 2.2.1.7 Generierung und Infektion von Knochenmarksmakrophagen

Für die Generierung von Knochenmarksmakrophagen erfolgte zunächst die sterile Präparation von Tibia und Femur weiblicher BALB/c Mäuse. Das Knochenmark wurde mit DPBS und einer Einmalspritze aus dem Knochen in eine Petrischale mit je 20 ml PBS gespült und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Petrischale anschließend mit 10 ml PBS gespült. Nach dem Pelletieren bei 161 x g und 4 °C für 5 min erfolgte der Transfer der Zellen in Zellkulturmedium und die Bestimmung der Zellzahl. Je  $2 \times 10^6$  Zellen wurden anschließend in 10 ml Medium in Petrischalen ausplattiert und alle 3 Tage mit je 3 ml frischem Medium versorgt. Nach 12 Tagen Differenzierung erfolgte die Ernte der Knochenmarksmakrophagen durch Schaben der Zellen. Für die Durchführung der Infektionsexperimente wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen in 500 µl Zellkulturmedium in eine 24-Loch Gewebekulturplatte ausplattiert. Die Infektion sowie Kontrollstimulation erfolgte in Duplikaten. Kontrollzellen wurden entweder mit Medium oder mit LPS inkubiert (0,5 µg/ml). Die Infektion

erfolgte mit 5, 10 oder 25 gereinigten *R. typhi* pro Zelle. Nach einer Inkubation von 24 und 48 Stunden wurde zum einen der Zellkulturüberstand geerntet, um die Konzentration der Zytokine IL-6, TNF $\alpha$  und IL-12 mittels ELISA sowie NO zu quantifizieren. Zum anderen wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch auf die Expression von MHCI, CD86 und iNOS analysiert sowie die Bakterienzahl mittels *realtime* PCR und Immunfluoreszenz bestimmt. Die durchflusszytometrische Analyse der Knochenmarksmakrophagen erfolgte am LSRII.

### 2.2.1.8 Durchflusszytometrische Analyse von murinen Zellen

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Charakterisierung von Zellen anhand ihrer Größe und Granularität. Zusätzlich kann eine quantitative Analyse fluoreszenzmarkierter Zellen vorgenommen werden. Die Quantifizierung kann dabei über die zelluläre Expression von Proteinen unter Verwendung Fluorochrom-gekoppelter AK erfolgen. Im Allgemeinen passieren im Durchflusszytometer Zellen in Suspension einzeln einen Laserstrahl. Das resultierende Streulicht wird von Fotomultiplikatoren detektiert. Es werden hierbei Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC), welches ein Maß für die Granularität der Zellen darstellt, von Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches die Größe der Zellen wiedergibt, unterschieden. Passieren Zellen, an deren Proteine fluorochrom-gekoppelten AK gebunden haben, den Laser, werden die jeweils emittierten Strahlen spezifisch je nach Fluorochrom detektiert. Das emittierte Licht verhält sich dabei proportional zum gebundenen AK.

Für die durchflusszytometrische Färbung wurde eine definierte Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Milzzellen,  $1 \times 10^5$  Leberzellen oder 30  $\mu$ l EDTA-Blut eingesetzt. Alle Inkubationsschritte erfolgten dunkel und bei 4 °C. Die Färbungen wurden wenn nicht anders angegeben in 96-Loch Rundboden-Gewebekulturplatten durchgeführt. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 350 x g für 5 min und 4 °C. Für die Färbung von Oberflächenmarkern wurden die Zellen nach dem Pelletieren zunächst mit je 20  $\mu$ l 5 % CohnII für die Absättigung der Fc-Rezeptoren für 20 min bei RT inkubiert. 50  $\mu$ l der ersten AK-Lösung (in FACS-Puffer) wurden anschließend direkt auf die Zellen gegeben und diese für weitere 30 min inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 100  $\mu$ l Perm/Wash Puffer um die Zellen auf eine intrazelluläre Färbung vorzubereiten. Folgend wurden die Zellen in 100  $\mu$ l Cytofox/Cytoperm aufgenommen und für 20 min bei 4 °C dunkel inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 100  $\mu$ l Perm/Wash Puffer erfolgte die Inkubation mit 20  $\mu$ l Perm/Wash Puffer und 5 % CohnII für 15 min bei RT. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50  $\mu$ l einer zweiten AK-Lösung (in Perm/Wash) für 30 min sowie zweimaliges Waschen mit je 150  $\mu$ l Perm/Wash Puffer. Für die Messung wurden die Zellen abschließend in je 150  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer Accuri C6 oder LSRII. Die Auswertung wurde mit der Software FlowJo durchgeführt.

### 2.2.1.9 Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Die Freisetzung von ROS wurde in Blutzellen durchflusszytometrisch durch Inkubation mit Dihydrorhodamin 123 ermittelt. Dieses wird in Anwesenheit von ROS in der Zelle zum fluoreszierenden Rhodamin oxidiert und kann im Durchflusszytometer bei einer Extinktions- und Emissions-Wellenlänge von 500 und 536 nm detektiert werden. Für den Nachweis von einer ROS-Produktion in Zellen erfolgte zunächst

die Färbung von 30 µl einer EDTA Blutprobe mit AK gegen verschiedene Oberflächenmarkern nach vorheriger Lyse der Erythrozyten. Die Zellen wurden folgend mit 30 µg/ml DHR-123 in PBS für 20 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert, anschließend einmal mit 4 ml kaltem PBS gewaschen und in 40 µl PBS aufgenommen. 40 µl der Zellsuspension wurden sofort nach der Färbung durchflusszytometrisch am BD Accuri C6 gemessen und die ROS-Freisetzung mittels FlowJo Analyse Software ausgewertet.

### 2.2.2 Biochemische Methoden

#### 2.2.2.1 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Das Verfahren des ELISA ermöglicht die Quantifizierung von Zytokinen im Zellkulturüberstand. Der Nachweis von IL-6, TNF $\alpha$  und IL-12 erfolgte im Zellkulturüberstand infizierter Knochenmarksmakrophagen unter Verwendung von IL-6 und TNF DuoSet ELISA Kits. Abweichend wurden für die Detektion von IL-12 folgende AK verwendet: Ratte anti-IL-12p40/p70 und Ratte anti-IL-12p40/p70 Biotin. Als Standard diente IL-12 eines DuoSet ELISA Kits der ausgehend von 2 ng/ml 1:2 titriert wurde. Die Durchführung wurde, wenn nicht anders angegeben, nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde eine 96-Loch ELISA-Platte mit je 50 µl *capture* AK beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Ungebundene AK wurden durch dreimaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt und freie Oberflächenbindungsstellen mit 100 µl ELISA-Blockpuffer für 2 Stunden bei RT blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden im nächsten Schritt 50 µl der unverdünnten Zellkulturüberstände in Duplikaten, sowie Doppelwerte der jeweiligen Konzentration des Zytokinstandards pipettiert. Die Bindung der AK erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Platten wurden erneut gewaschen und anschließend 50 µl biotinylierter Sekundär-AK in 1x PBS/0.1 % BSA auf die Platte gegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer erfolgte die Bindung eines Streptavidin-HRP (horse radish peroxidase)-Konjugats. Dieses wurde in einer Verdünnung von 1:200 in 50 µl 1x PBS/0.1 % BSA eingesetzt und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden je 100 µl ELISA-TMB-Substratlösung pipettiert und die Reaktion, nach Erreichen einer sichtbaren Färbung, durch Zugabe von 25 µl ELISA-Stopplösung beendet. Im direkten Anschluss erfolgte die Detektion der Zytokinkonzentration anhand des Standards photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm. Hierfür wurde der *Mikroplate reader* Dynex MRXII und die *Revelation* Software verwendet.

#### 2.2.2.2 *Bestimmung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Werte (GPT) im Serum*

In Serum freigesetztes GPT ist ein direkter Indikator für das Auftreten eines Leberzellschadens. Für die Bestimmung der GPT-Konzentration im Serum wurde das Reflotron Plus System verwendet und die Detektion nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das verwendete Verfahren beruht auf der Reaktion von Ketoglutarat und Alanin, die in Anwesenheit von GPT im Serum zu Glutamat und Pyruvat umgesetzt werden. Das entstehende Pyruvat wird im zweiten Reaktionsschritt unter Einwirkung von Pyruvat-Oxidase in Acetylphosphat, Kohlendioxid und Wasserstoffperoxid gespalten, das einen Indikator unter der Einwirkung von POD in seine oxidierte blaue Form überführt. In einer

kinetischen Messung bei 567 nm wird die Bildung des Farbstoffs als Maß für die Enzymaktivität der GPT detektiert. Das Serum wurde hierfür vor dem Test 1:3 in PBS verdünnt und 32 µl Lösung auf einen GPT-Teststreifen pipettiert.

### 2.2.2.3 Bestimmung der Zytokinkonzentration im Plasma

Für die Bestimmung der Zytokinkonzentration im Plasma der Mäuse wurde der *Bead*-basierte Immunoassay *LEGENDplex* verwendet. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip eines *Sandwich* Immunoassays, bei dem ein löslicher Analyt zwischen zwei AK gebunden wird. Durch die Verwendung zweier *Bead*-Populationen von verschiedener Größe und unterschiedlicher Fluoreszenz können simultan verschiedene Zytokine in einer biologischen Probe durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Die Konzentrationen einzelner Zytokine werden anhand einer Standardkurve ermittelt. Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Abweichend erfolgte die Analyse mit halbierten Proben- und Reagenzmengen. Demnach wurden 12,5 µl Plasma vor dem Assay 1:2 mit 12,5 µl Assay-Puffer verdünnt und 12,5 µl der Lösung eingesetzt. Die Messung der Proben erfolgte am Accuri C6, während die Auswertung mittels BioLegend *LEGENDplex* Software durchgeführt wurde.

### 2.2.2.4 Detektion von Stickstoffmonoxid (NO)

Die Produktion von NO ist ein wichtiger Bestandteil der bakteriziden Funktion von Makrophagen als Reaktion auf die Erkennung von Erregern. Bei der *in vitro*-Infektion von Makrophagen wird NO dabei in den Zellkulturüberstand freigesetzt und kann mit der so genannten Griess-Reaktion quantifiziert werden. Dieses Verfahren beruht auf der Umsetzung der Griess-Reagenzien mit Nitrit zu einem Diazofarbstoff, dessen Absorption im sichtbaren Bereich bei 560 nm gemessen werden kann. Für den Nachweis von NO wurden 100 µl Zellkulturüberstand in 96-Loch Gewebekulturplatten überführt und mit 50 µl Griess 1 sowie 50 µl Griess 2 Lösung gemischt. Eine serielle Verdünnung von Natriumnitrit (125 µM) in Zellkulturmedium, in Duplikaten, diente als Standard für die Quantifizierung der NO-Konzentration. Die Absorption wurde bei 560 nm unter Verwendung eines *Microplate readers* Dynex MRXII spektrophotometrisch quantifiziert und mittels Revelation Software ausgewertet.

### 2.2.2.5 Detektion von *R. typhi* in der Immunfluoreszenz

Für den Nachweis von *R. typhi* in Zellen wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in 10 µl PBS auf einen maskierten Objektträger überführt und für 20 min getrocknet. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 50 ml Aceton in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 10 min bei -20 °C. Nach dem Abdampfen des Acetons wurden 10 µl AK-Überstand (*R. typhi* BNITM52) für den Nachweis von *R. typhi* pipettiert und für 30 min bei 37 °C dunkel inkubiert. Als Kontrolle dienten 10 µl PBS sowie 10 µl Maus-IgG3 Isotyp AK. Nach zehnmaligem Waschen mit PBS in einer Glasküvette wurde der Objektträger getrocknet und die Zellen mit 10 µl DAPI sowie Ziege anti-Maus IgG3-FITC in PBS wie oben beschrieben inkubiert. Nach einem erneuten zehnmaligen Waschschrift in PBS erfolgte die Färbung mit 10 µl anti-FITC-Alexa 488 im Dunkeln für 30 min bei 37 °C, um die Färbung des Sekundär-AK zu verstärken. Nicht gebundener AK wurde wiederum mit einem Waschschrift entfernt, der Objektträger getrocknet und anschließend

mit Permaflour und einem Deckgläschen eingedeckelt. Die Analyse der Immunfluoreszenz erfolgte am Mikroskop BZ9000.

### 2.2.2.6 Histologische und immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten

Für die histologische und immunhistochemische Färbung von Geweben wurden die Organe zunächst präpariert und in 4 % Formalin überführt und fixiert. Alle folgenden Schritte wurden von der Mauspathologie Facility des Universitätsklinikums Eppendorf durchgeführt. Die Einbettung der Organe erfolgte in Paraffin für die anschließende Herstellung der Gewebeschnitte. Nachfolgend wurden die Schnitte deparaffiniert, indem sie zunächst für 20 min auf 65 °C in einem Wärmeschrank erhitzt wurden. Für die Entparaffinierung erfolgte eine Behandlung mit Xylol für 30 Min und sequentielles Eintauchen für 3-5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 % und 70 % Ethanol), mit einem anschließenden Waschschrift in H<sub>2</sub>O. In einem nächsten Schritt wurden die Schnitte entweder histologisch mit Hematoxylin und Eosin (HE) oder immunhistochemisch mit AK gefärbt. Die Gewebeschnitte wurden abschließend mit Tissue-Tek Medium und entsprechendem Deckgläschen eingedeckt und am Mikroskop BZ9000 analysiert.

#### Hematoxylin-Eosin-Färbung

Die Schnitte wurden für die Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE) 5 min in Hämatoxylin inkubiert und anschließend mit Leitungswasser gespült. Die Differenzierung wurde in 25 % HCl für 5 min durchgeführt und die Schnitte folgend mit fließendem Leitungswasser erneut gespült. Anschließend wurden diese kurz in 70 % Ethanol gebläut und 1 min mit Eosin gefärbt. Abschließend wurden die Schnitte mit 100 % Ethanol gespült.

#### Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Färbung erfolgte zunächst eine Antigendemaskierung der entparaffinierten Schnitte für 30 min in 10 mM Zitratpuffer (10 mM Natriumzitrat, 0,05 % Tween 20, pH 6,0). Die eigentliche immunhistochemische Färbung wurde in einem Ventana Benchmark XT Gerät durchgeführt und die verschiedenen AK hierfür in in einer Lösung aus 5% Ziegen Serum in TBS, 0,1% Triton X100 und *antibody diluent solution* verdünnt. Für die Färbung wurden die Schnitte 1 Stunde mit den jeweiligen Primär-AK bei RT inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. anti-Hase-, anti-Ratte- oder anti-Maus-Histofine Simple Stain Mouse MAX Peroxidase Sekundär-AK wurden zur Detektion verwendet und je ein Tropfen für 30 min bei RT inkubiert. Die immunhistochemische Färbereaktion wurde mit dem *ultraview universal DAB detection kit* durchgeführt, gefolgt von Wässern zum Abstoppen der Reaktion.

### 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.3.1 DNS-Aufreinigung aus eukaryotischen Zellen und Geweben

Für die Aufreinigung von DNS aus eukaryotischen Zellen und Geweben wurde das QIAamp DNA Mini Kit nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.  $1 \times 10^6$  eukaryotische Zellen oder 80  $\mu$ l homogenisiertes murines Gewebe wurden für die DNS-Gewinnung eingesetzt. Um DNS aus Geweben aufzureinigen, erfolgte zuvor die Homogenisierung von 10 mg Organ in 500  $\mu$ l PBS mit Hilfe von *Precellys ceramic Kit tubes* in einem Precellys 24 Homogenisierer. Folgende Zyklusparameter wurden verwendet: 2-mal 6000 rpm für je 45 sek mit je 60 sek Pause. Nach der Aufreinigung der DNA erfolgte die Bestimmung der DNS-Konzentration mittels NanoDrop und NanoDrop 2000/2000c Software.

#### 2.2.3.2 Detektion von *R. typhi* mittels *realtime* Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in eukaryotischen Zellen und Geweben

Die *realtime* PCR ist ein Verfahren zur spezifischen Amplifikation und Quantifizierung von DNS-Sequenzen. Die Methode beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR von Denaturierung, *Primer*-Anlagerung und Elongation einer Doppelstrang-DNS. Zusätzlich ist durch die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs, der in die doppelsträngige DNS interkaliert, die Quantifizierung des Zielgens möglich. Die Fluoreszenz des Farbstoffs nimmt proportional mit der amplifizierten Menge des PCR-Produkts zu, wobei die Quantifizierung in der exponentiellen Phase eines Zyklus anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale erfolgt. Zu diesem Zweck wird in einer Verdünnungsreihe ein Standardplasmid mit definierter Kopienzahl bei jeder *realtime* PCR zusätzlich amplifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Farbstoff *SYBR Green* verwendet. Die Quantifizierung von *R. typhi* mittels *SYBR Green realtime* PCR erfolgte durch Amplifikation eines 137 bp Fragments des *PrsA* Gens (RT0565). Hierfür wurden der Forward Primer 5'-ACA GCT TCA AAT GGT GGG GT-3' und der Reverse primer 5'-TGC CAG CCG AAA TCT GTT TTG-3' verwendet. Für die genaue Bestimmung der Kopienzahl von *R. typhi* wurde das Standardplasmid pCR2.1-*PrsA* verwendet, das dieselbe *PrsA* DNS-Sequenz enthielt. Die PCR erfolgte im Rotor Gene 6000 und wurde mit der Software Rotor-Gene 600 Series analysiert. Die Amplifikation erfolgte in folgenden Schritten in 40 Zyklen:

**Tabelle 2.13:** Zykluseigenschaften

Schritt	Temperatur / Zeit
Vorheizen	95 °C / 15 min
Denaturierung	94 °C / 20 sek
<i>Annealing</i>	53 °C / 30 sek
Elongation	72 °C / 20 sek

Der Reaktionsansatz für die *realtime* PCR setzte sich in 10  $\mu$ l wie folgt zusammen:

## 2 Materialien und Methoden

**Tabelle 2.14:** Reaktionsansatz realtime PCR

Reagenz	Menge
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTPs	0,175 mM
<i>Forward Primer</i>	100 nM
<i>Reverse Primer</i>	100 nM
<i>SYBR Green</i>	0,05x
HotStar Tag DNA Polymerase	0,25 U
DNS-Probe	2 µl
dH <sub>2</sub> O (Ampuwa)	add. 10µl

### 2.2.4 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden nach den gesetzlichen Bestimmungen des deutschen Tierschutzes durchgeführt und vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Hamburg genehmigt. Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte unter der Tierversuchsantrag Nummer 88/13. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden weibliche Mäuse im Alter zwischen 6-10 Wochen der Stämme BALB/c, C57BL/6, RAG1 KO und CB17 SCID verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte in *Individually ventilated cages* (IVC, Käfige mit individueller Belüftung) unter keimarmen Bedingungen im Tierhaus des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin.

#### 2.2.4.1 Infektion von Mäusen und klinische Bewertung

Die Infektion der Mäuse erfolgte s.c. in die Schwanzwurzel mit je 50 µl *R. typhi*-Inokulat in PBS. Kontrollmäuse bekamen analog 50 µl PBS appliziert. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde anhand eines Klinischen Bewertungssystems für 28 Tage beurteilt. Hierfür wurden die Mäuse in einem Rhythmus von 2 bis 3 Tagen beobachtet und ihr Gesundheitszustand mit folgenden Kriterien beurteilt: Zustand des Fells (0: normal, 1: struppig im Nacken, 2: struppig am ganzen Körper), die Körperhaltung (0: normal, 1: teilweise/zeitweise gekrümmt, 2: gekrümmt), Aktivität (0: normal, 1: reduziert, 2: keine), Gewichtsverlust (0: < 10%, 1: 10-14%, 2: > 15%) sowie Aufnahme von Futter und Wasser (0: normal, 1: reduziert, 2: keine). Mäuse wurden als gesund beurteilt mit einer klinischen Bewertung von < 5, moderat erkrankt von 5 bis 7 and schwer erkrankt von 8 bis 10. Bei einer klinischen Bewertung  $\geq 8$  oder einem Gewichtsverlust  $\geq 20$  % wurden die Mäuse durch eine Überdosierung einer CO<sub>2</sub>-Narkose tierschutzgerecht erlöst.

#### 2.2.4.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte entweder submandibulär durch Punktion der *Vena faciales* im Unterkieferbereich der Mäuse oder durch Herzpunktion nach dem Erlösen der Mäuse. Für die durchflusszytometrische Überprüfung der Neutrophil-Depletion, wurde submandibulär im Rhythmus von 3 Tagen

## 2 Materialien und Methoden

Blut entnommen. Eine Herzpunktion erfolgte für die Gewinnung von Plasma und Serum, um eine Bestimmung der Zytokinkonzentration bzw. der GPT-Werte vorzunehmen. Für Plasmaproben wurde das Blut direkt in EDTA-Röhrchen überführt und bei 5654 x g für 10 min zentrifugiert. Um Serumproben zu erhalten, erfolgte der Transfer des Blutes in *Safe-Seal*- Reaktionsgefäße. Nach der Agglutination des Blutes für 15 bis 20 min bei Raumtemperatur, wurde das Serum durch Zentrifugation für 10 min bei 5654 x g gewonnen. Serum- und Plasmaproben wurden vor der Analyse bei -20 °C gelagert.

### 2.2.4.3 Depletion von Neutrophilen

Für die Depletion von Neutrophilen wurde den Mäusen 200 µg anti-Ly6G AK alle 3 Tage ab Tag 6 nach Infektion intraperitoneal injiziert. Eine ebenfalls infizierte Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge eines Ratte IgG2a Isotyp AK. Um einen Einfluss des Depletions-AK auf den Krankheitsverlauf der Mäuse auszuschließen, wurde eine zweite Kontrollgruppe mit PBS behandelt und ebenfalls der anti-Ly-6G AK appliziert. Als interne Kontrolle wurden Mäuse mit PBS-behandelt und PBS intraperitoneal injiziert. Der Infektionsverlauf wurde wie oben beschrieben verfolgt und die Depletion der Neutrophilen anhand einer durchflusszyometrischer Färbung von Blutzellen jeweils 1 Tag nach Depletion analysiert.

### 2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.02. Die Analyse der Überlebensrate der Tiere wurde mittels *Log-rank Mantel Cox Test* durchgeführt. Bei einer Stichprobengröße  $n \geq 8$  wurde der *D'Agostino-Pearson Test* auf Normalverteilung durchgeführt. Waren die Daten normal verteilt (parametrisch), wurde entweder ein Zweistichproben-t-Test für den Vergleich zweier Stichproben oder eine *Two way ANOVA* mit anschließendem *Tukey Test* durchgeführt, um Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen zu bewerten. Nicht-parametrische Daten wurden mit dem *Mann-Whitney U Test* (zwei Stichproben) oder *Kruskal-Wallis Test* gefolgt von *Dunns Posttest* (mehr als zwei Stichproben) analysiert.

## 3 Ergebnisse

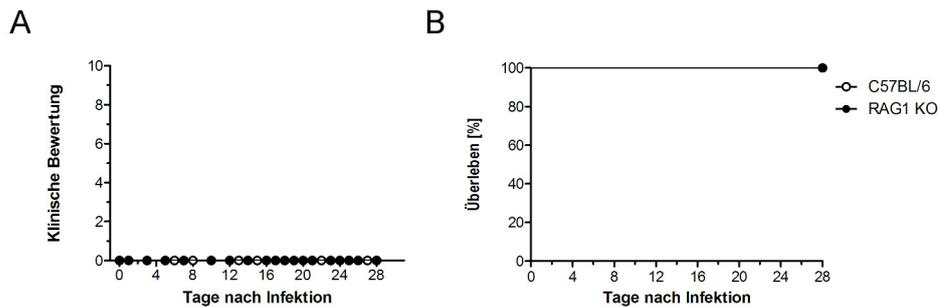
*R. typhi* ist ein humanpathogenes intrazelluläres Bakterium, welches im Menschen endemisches Fleckfieber verursacht. Bei einem schweren Verlauf kann die Infektion zum Tod des Patienten führen. Zu den dann auftretenden Symptomen gehören Fieber, Kopfschmerzen und Übelkeit. Darüber hinaus kommt es zu Erkrankungen wie Lungen- und Hirnentzündung, Leberschäden und Nierenversagen [91, 106, 107, 132]. Über die Immunantwort gegenüber *R. typhi* ist bislang wenig bekannt. Zudem ist unklar ob die Immunantwort möglicherweise zu der auftretenden Pathologie beiträgt. Gegenstand der vorliegenden Arbeit, war deshalb die Untersuchung angeborener Immunmechanismen und ihr Beitrag zur Pathologie in der Maus. Der erste Abschnitt des Ergebnisteils beschreibt die Etablierung eines geeigneten murinen Infektionsmodells, um die angeborene Immunantwort auf *R. typhi* sowie die Pathologie zu untersuchen. Im zweiten Abschnitt wird die angeborene Immunantwort nach *R. typhi*-Infektion näher beschrieben. Die funktionelle Charakterisierung angeborener Immunzellen während der Infektion im Modell der CB17 SCID Maus ist Gegenstand des dritten Teils dieser Arbeit. Im letzten Abschnitt dieser Arbeit ist speziell die Untersuchung des Beitrags der Neutrophilen an der Pathologie in der *R. typhi*-Infektion in der CB17 SCID Maus dargestellt.

### 3.1 Etablierung eines *R. typhi*-Infektionsmodells

In der vorliegenden Arbeit sollte die angeborene Immunantwort auf das humanpathogene Bakterium *R. typhi* in der Maus und ihr Beitrag zum Schutz und zur Pathologie untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurde ein *in vivo* Infektionsmodell etabliert. Um geeignete Mausstämme für diese Analysen zu finden, wurden Wildtyp C57BL/6 und BALB/c Mäuse sowie entsprechende B- und T-Zell-defiziente Mäuse derselben Stämme verwendet: RAG1 KO Mäuse [126], die auf dem C57BL/6 Hintergrund gezüchtet wurden, und zum anderen CB17 SCID Mäuse [127, 128], deren genetischer Ursprung die BALB/c Maus ist. Die Infektion erfolgte s.c. in die Schwanzwurzel der Mäuse, da die natürliche Infektion über das subkutane Einbringen der Erreger in den Organismus stattfindet [84]. Folgend wurde der Infektionsverlauf anhand eines klinischen Bewertungssystems beurteilt und die Überlebensrate der Mäuse bestimmt. Zusätzlich wurde die Bakterienlast in den Organen mittels einer *R. typhi*-spezifischen realtime PCR bestimmt. Pathologische Veränderungen in der Leber wurden mittels histologischer Untersuchungen und anhand der Messung von Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) -Werten im Serum, als Indikator für eine Leberzellschädigung, analysiert. Die Immunantwort wurde durch Messung der systemischen Zytokinproduktion im Plasma untersucht und verschiedene Zellpopulationen funktionell näher charakterisiert.

### 3.1.1 C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse scheinen resistent gegenüber einer *R. typhi*-Infektion zu sein

C57BL/6 Mäuse werden als resistent gegenüber einer Infektion mit *R. typhi* beschrieben [111]. Darüber hinaus zeigte eine vorangegangene Studie, dass sogar B- und T-Zell-defiziente RAG1 KO Mäuse dieses Stammes die Infektion mit Zeckenbissfieber-Rickettsien, wie *R. conorii*, für mindestens 3 Wochen überleben [129]. Mäuse des C57BL/6 Stammes bilden daher offenbar eine effiziente angeborene Immunantwort aus und sind in der Lage diese Erreger zu kontrollieren. Für die Bakterien der Fleckfieber-Gruppe ist dies jedoch noch unklar. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob die angeborene Immunantwort in B- und T-Zell-defizienten RAG1 KO Mäusen in der Lage ist, auch die Infektion mit *R. typhi* abzuwehren. Hierfür wurden C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse infiziert und der Infektionsverlauf beobachtet (Abbildung 3.1, A). C57BL/6 Kontrollmäuse blieben für den Untersuchungszeitraum symptomfrei. Auch RAG1 KO Mäuse zeigten zu keinem Zeitpunkt während der Infektion Krankheitssymptome wie Gewichtsverlust, struppiges Fell, Aktivitätsverlust und reduzierte Wasser- und Futterraufnahme. Alle C57BL/6 Kontrollmäuse und alle RAG1 KO Mäuse überlebten die ersten 28 Tage der Infektion (Abbildung 3.1, B).



**Abbildung 3.1: Verlauf einer *R. typhi*-Infektion in Wildtyp C57BL/6 und immundefizienten RAG1 KO Mäusen.** Die Infektion von C57BL/6 (weiße Symbole,  $n = 10$ ) und RAG1 KO Mäusen (schwarze Symbole,  $n = 10$ ) erfolgte mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* s.c. in die Schwanzwurzel. **(A)** Der Infektionsverlauf wurde zu den angegebenen Zeitpunkten anhand eines klinischen Bewertungssystems für 28 Tage beurteilt. **(B)** Die Überlebensrate (rechts) wurde dokumentiert und mittels Log-rank Test analysiert ( $ns\ p = 1,0$ ). Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2 unabhängigen Experimenten. Klinische Bewertung (0-10): gesund (0-4), moderat erkrankt (4-7) oder schwer erkrankt (8-10).

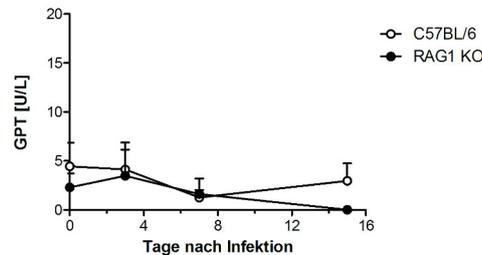
Mittels realtime PCR wurde darüber hinaus die Bakterienlast in verschiedenen Organen bestimmt. Sowohl C57BL/6 als auch RAG1 KO Mäuse entwickelten zu keinem Zeitpunkt während der initialen Phase einer *R. typhi*-Infektion eine nachweisbare Bakterienlast in Milz, Hirn, Leber und Lunge (Daten nicht gezeigt).

#### 3.1.1.1 Pathologie *R. typhi*-infizierter RAG1 KO Mäuse

*R. typhi*-infizierte C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse wiesen nach Sektion keine auffälligen pathologischen Veränderungen wie eine vergrößerte Milz auf. Um mögliche pathologische Veränderungen der Leber infolge der Infektion zu beurteilen, wurden GPT-Werte im Serum von C57BL/6 und RAG1 KO Mäusen gemessen (Abbildung 3.2). Weder C57BL/6 Kontrollmäuse noch RAG1 KO Mäuse wiesen

### 3 Ergebnisse

einen Anstieg der Serum-GPT-Werte im Verlauf der Infektion auf. In der histologischen Untersuchung zeigte sich jedoch eine leichte zelluläre Infiltration sowie ein schwacher transients Leberschaden in beiden Mausgruppen zwischen Tag 3 und 10 (Daten nicht gezeigt).



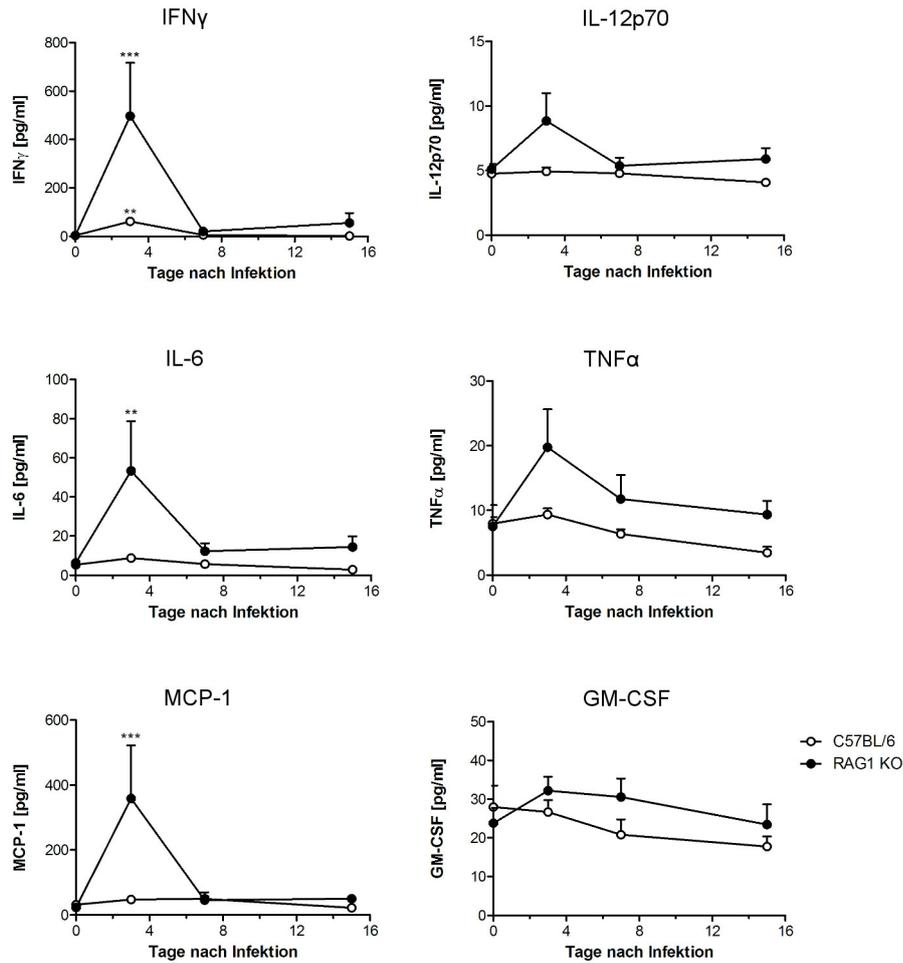
**Abbildung 3.2: C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse entwickeln keinen Leberschaden nach s.c. Infektion mit *R. typhi*.** Gezeigt sind die GPT-Werte im Serum von C57BL/6 (weiße Symbole, n = 5-7) und RAG1 KO Mäusen (schwarze Symbole, n = 5-7) nach s.c Infektion mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* in die Schwanzwurzel zu den genannten Zeitpunkten. Dargestellt sind Daten zweier unabhängiger Experimente. Die Analyse der statistischen Signifikanzen erfolgte mittels *Kruskal-Wallis-Test* und anschließendem *Dunns Posttest* (*nicht signifikant (ns)*).

#### 3.1.1.2 Immunantwort gegen *R. typhi* in C57BL/6 und RAG1 KO Mäusen

##### 3.1.1.2.1 C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse zeigen eine frühe systemische Zytokinantwort

Um einen Hinweis auf die Immunantwort nach einer *R. typhi*-Infektion zu erhalten, wurde die systemische Zytokinkonzentration infizierter C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse ermittelt. Hierfür wurde an Tag 3, 7 und 15 nach Infektion sowie von nicht-infizierten Kontrollmäusen (Tag 0) mittels *LEGENDplex* Assay die Zytokinproduktion im Plasma bestimmt (Abbildung 3.3). RAG1 KO Mäuse zeigten nur einen geringen Anstieg von IL-12p70 ( $8,8 \pm 2,2$  pg/ml) und TNF $\alpha$  ( $19,8 \pm 5,9$  pg/ml) im Plasma an Tag 3 nach Infektion, während ein Anstieg beider Zytokine in C57BL/6 nicht detektierbar war. Sowohl IL-6 ( $53,4 \pm 25,3$  pg/ml) als auch MCP-1 ( $358,6 \pm 163,8$  pg/ml) waren ausschließlich an Tag 3 nach Infektion in RAG1 KO, aber nicht in C57BL/6 Mäusen, signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu waren signifikant erhöhte IFN $\gamma$ -Werte sowohl in RAG1 KO ( $497,1 \pm 219,8$  pg/ml) als auch C57BL/6 Mäusen ( $61,9 \pm 12,6$  pg/ml) ebenfalls ausschließlich an Tag 3 zu messen. Die IFN $\gamma$ -Konzentration war dabei in RAG1 KO gegenüber C57BL/6 Mäusen 7,6-fach höher. Eine Erhöhung der Zytokinkonzentration von GM-CSF konnte darüber hinaus in keinem der beiden Mausstämme gemessen werden. Bereits an Tag 7 war keines der Zytokine im Plasma infizierter Mäuse beider Gruppen mehr nachweisbar.

### 3 Ergebnisse



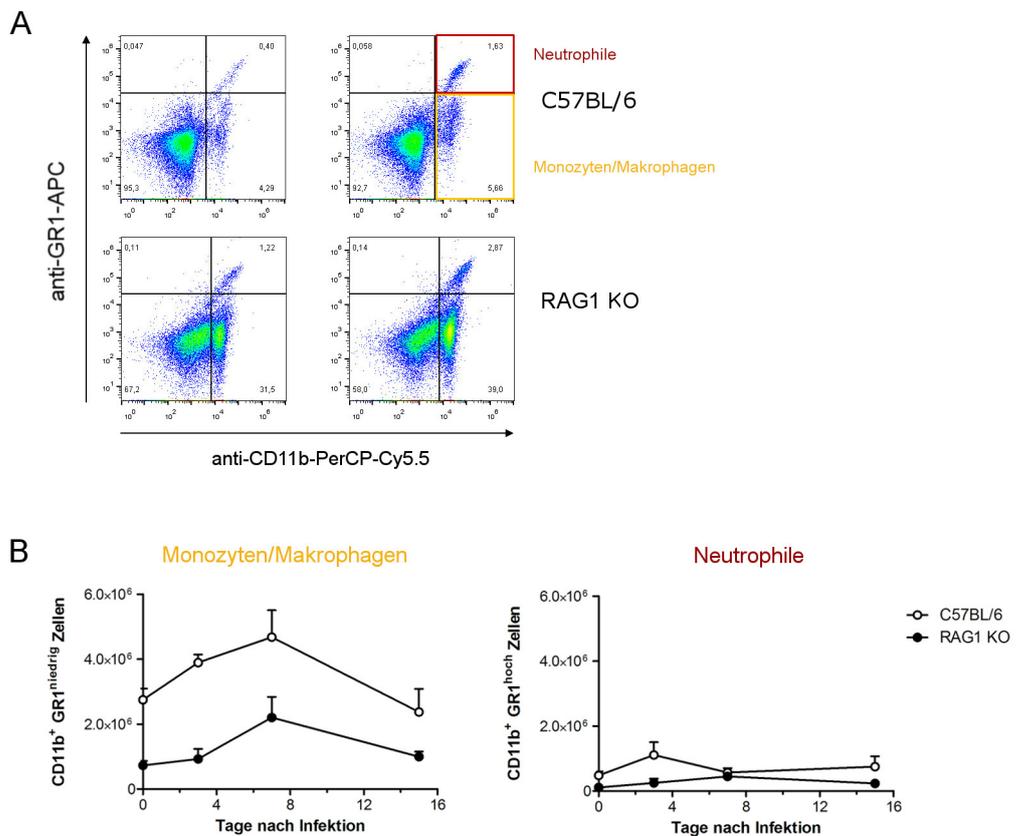
**Abbildung 3.3: RAG1 Mäuse zeigen eine nur leichte systemische Inflammation während der initialen Phase einer *R. typhi*-Infektion.** C57BL/6 (weiße Symbole, n = 5-8) und RAG1 KO Mäuse (schwarze Symbole, n = 5-8) wurden mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* s.c. in die Schwanzwurzel infiziert. Die Analyse der systemischen Zytokinproduktion erfolgte mit Hilfe des bead-basierten *LEGENDplex* Assays im Plasma der Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten. Gezeigt sind Daten zweier unabhängiger Experimente. Für die statistische Auswertung wurden die Zytokinkonzentrationen nach Infektion mit Basalwerten PBS-behandelter Mäuse (Tag 0) verglichen und mittels *Kruskal-Wallis-Test* und anschließendem *Dunns Posttest* analysiert (\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

#### 3.1.1.2.2 C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse zeigen einen frühen Anstieg von Monozyten/Makrophagen

Für die Untersuchung der Immunantwort auf zellulärer Ebene wurde die Zellkomposition in der Milz über den Infektionsverlauf an Tag 0, 3, 7 und 15 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrollgruppe dienten PBS-behandelte Mäuse (Tag 0). Abbildung 3.4, A zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Analyse von C57BL/6 und RAG1 KO Milzzellen. Nach der Isolation der Zellen wurden diese mit einem CD11b sowie GR1 AK gefärbt. Die Färbung dieser Oberflächenmoleküle erlaubt die Differenzierung zwischen CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen und CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophilen [133]. Die Infektion von C57BL/6 Mäusen und RAG1 KO Mäusen führte zu einem tendenziell-

### 3 Ergebnisse

len, jedoch nicht signifikanten, Anstieg der Monozyten/Makrophagen in der Milz bis Tag 7. Dabei war die Zahl dieser Zellen in C57BL/6 Mäusen gegenüber nicht-infizierten Mäusen etwa 1,7-fach erhöht ( $2,75 \times 10^6$  auf  $4,68 \times 10^6$ ), in RAG1 KO Mäusen etwa 3-fach ( $7,29 \times 10^5$  auf  $2,2 \times 10^6$ ). Die Zahl der Monozyten/Makrophagen nahm in beiden Mausgruppen bis Tag 15 wieder auf Ausgangsniveau ab. Die Zahl der Neutrophilen war in C57BL/6 Mäusen lediglich an Tag 3 erhöht und zu diesem Zeitpunkt etwa verdoppelt ( $4,78 \times 10^5$  auf  $1,11 \times 10^6$ ). Neutrophile in der Milz von RAG1 KO Mäusen zeigten hingegen einen länger anhaltenden Anstieg bis Tag 7. Dabei vervierfachte sich die Zahl von  $1,01 \times 10^5$  auf  $4,48 \times 10^5$ , dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 3.4: C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse zeigen eine tendenzielle Zunahme der Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen in der Milz.** C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse wurden s.c. mit  $1 \times 10^8$  Bakterien in die Schwanzwurzel infiziert. **(A)** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen durchflusszytometrischer Analysen von Milzzellen einer PBS-behandelten (links) sowie einer *R. typhi*-infizierten Maus an Tag 15 nach Infektion (rechts) nach Färbung mit einem CD11b-PerCP-Cy5.5 (x-Achse) und GR1-APC AK (y-Achse). CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophile (rot) wurden von CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen (orange) unterschieden. **(B)** Gezeigt sind absolute Zahlen CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen (links) sowie CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophilen (rechts) zu den angegebenen Zeitpunkten in der Milz von C57BL/6 (weiße Symbole, n = 5-7) und RAG1 KO Mäusen (schwarze Symbole, n = 5-6). Daten wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten erstellt und sind als Mittelwerte ± SEM gezeigt. Die Analyse der statistischen Signifikanzen erfolgte mittels *Kruskal-Wallis-Test* und anschließendem *Dunns Posttest* (ns).

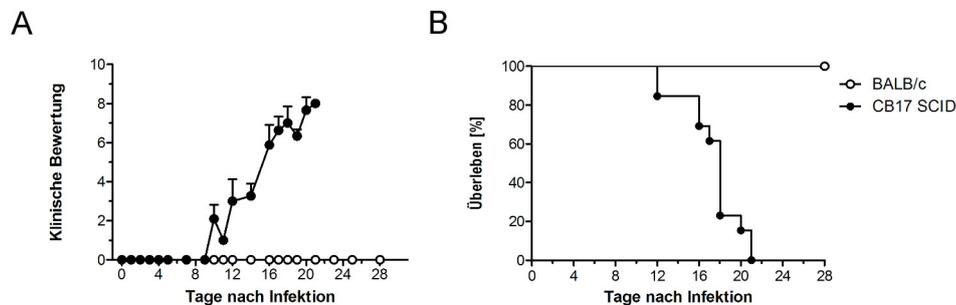
Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass sowohl immunkompetente C57BL/6 als auch die B- und T-Zell-defizienten RAG1 KO Mäuse die initiale Phase einer *R. typhi*-Infektion überleben. Dabei entwickelt keine der beiden Mausgruppen eine nachweisbare Bakterienlast oder eine symptomatische Erkrankung.

### 3 Ergebnisse

Die angeborene Immunantwort ist in diesen Mäusen insbesondere durch die frühe Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  gekennzeichnet. RAG1 KO Mäuse produzieren darüber hinaus vorübergehend auch MCP-1 und geringe Mengen IL-12, IL-6  $\text{TNF}\alpha$ . Auf zellulärer Ebene zeigen sowohl C57BL/6 als auch RAG1 KO Mäuse einen vorübergehenden Zunahme von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen, die mit dem frühen Anstieg der Zytokinkonzentrationen einhergeht.

#### 3.1.2 CB17 SCID Mäuse sind suszeptibel für die Infektion mit *R. typhi*

Als ein weiterer resistenter Mausstamm wurden BALB/c Mäuse beschrieben [124]. In diesem Abschnitt sollte nun untersucht werden, ob angeborene Immunmechanismen auch in diesem Mausstamm vor einer symptomatischen Erkrankung schützen. Aus diesem Grund wurden neben BALB/c Mäusen CB17 SCID Mäuse, die ebenfalls defizient in der Entwicklung von B- und T-Zellen [127, 128] sind, untersucht. Zunächst wurden in einem Vorversuch immunkompetente BALB/c Mäuse als Kontrollgruppe und CB17 SCID Mäuse s.c. mit einer Dosis von  $1 \times 10^8$  Bakterien in die Schwanzwurzel infiziert und der Krankheitsverlauf beobachtet (Abbildung 3.5, A) sowie die Überlebensrate der Mäuse bestimmt (Abbildung 3.5, B). BALB/c Mäuse zeigten zu keinem Zeitpunkt während der Infektion Krankheitssymptome und überlebten die Infektion mit *R. typhi*. Im Gegensatz dazu wiesen CB17 SCID Mäuse sehr früh 10 Tage nach Infektion die ersten Krankheitssymptome auf. Charakteristische Symptome waren zunächst struppiges Fell, gefolgt von reduzierter Futter- und Wasseraufnahme, Gewichtsverlust und verminderte Aktivität. Die Mäuse wurden mit schweren Symptomen in der Regel zwischen Tag 12 und Tag 21 erlöst.

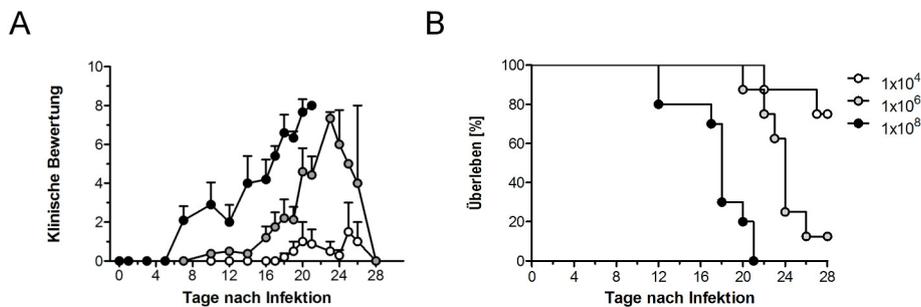


**Abbildung 3.5: Verlauf einer *R. typhi*-Infektion in Wildtyp BALB/c und B- und T-Zell-defizienten CB17 SCID Mäusen.** Die Infektion von BALB/c und CB17 SCID Mäusen erfolgte s.c. in die Schwanzwurzel mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi*. (A) Mit Hilfe eines klinischen Bewertungssystems wurde der Gesundheitszustand der Mäuse über einen Zeitraum von 28 Tagen beurteilt. (B) Die Überlebensrate wurde dokumentiert und mittels *Log-rank Test* analysiert (\*\*\*)  $p = 0,0001$ ). Klinische Bewertung (0-10): gesund (0-4), moderat erkrankt (4-7) oder schwer erkrankt (8-10).

Diese Ergebnisse zeigen, dass CB17 SCID Mäuse im Gegensatz zu RAG1 KO Mäusen für die Infektion mit *R. typhi* hochsuszeptibel sind. Damit stand ein geeignetes Infektionsmodell zur Verfügung, um die angeborenen Immunmechanismen zu charakterisieren und zu analysieren, welche möglicherweise zur Pathologie während einer *R. typhi*-Infektion beitragen.

### 3.1.2.1 Bestimmung der letalen Dosis in CB17 SCID Mäusen

Für weitere experimentelle Arbeiten wurde folgend die genaue letale Infektionsdosis (LD100) bestimmt. Hierfür wurden die Mäuse mit  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^8$  *R. typhi* infiziert und der Krankheitsverlauf dokumentiert (Abbildung 3.6, A) sowie die Überlebensrate bestimmt (Abbildung 3.6, B). 75 % der Mäuse überlebten die Infektion mit der niedrigsten Dosis von  $10^4$  Bakterien. Diese Mäuse entwickelten nur leichte Krankheitssymptome ab Tag 18, von denen sie sich aber wieder erholten. Mäuse, welche mit  $1 \times 10^6$  Bakterien infiziert wurden, zeigten bereits die ersten Symptome an Tag 9. Bei diesen lag die Überlebensrate bei nur noch 12,5 %. Mäuse welche mit der höchsten Dosis von  $1 \times 10^8$  Bakterien infiziert wurden, entwickelten bereits in der ersten Woche nach Infektion die ersten Anzeichen einer Erkrankung. In dieser Gruppe wurden alle Mäuse aufgrund schwerer Krankheitssymptome innerhalb von 21 Tagen erlöst. Im Folgenden wurden alle Experimente mit der letalen Dosis von  $1 \times 10^8$  Bakterien durch s.c. Injektion in die Schwanzwurzel durchgeführt.

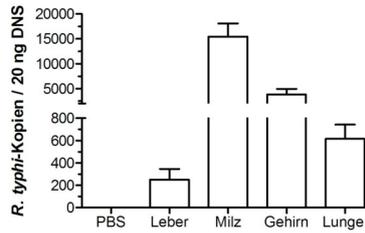


**Abbildung 3.6: Titration der infektiösen Dosis in CB17 SCID Mäusen.** CB17 SCID Mäuse wurden mit  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  oder  $1 \times 10^8$  *R. typhi* s.c. in die Schwanzwurzel infiziert und der Infektionsverlauf mit Hilfe eines klinischen Bewertungssystems (A) für 28 Tage beurteilt sowie die Überlebensrate (B) dokumentiert und mittels *Log-rank Test* analysiert (\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ ). Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2 unabhängigen Experimenten (n = 8-10). Klinische Bewertung (0-10): gesund (0-4), moderat erkrankt (4-7) oder schwer erkrankt (8-10).

### 3.1.2.2 *R. typhi*-infizierte CB17 SCID Mäuse zeigen eine hohe Bakterienlast

Um eine Ausbreitung des Erregers im Organismus zu untersuchen, wurde die Bakterienlast in CB17 SCID Mäusen in Leber, Milz, Gehirn, und Lunge mit Hilfe einer *R. typhi*-spezifischen realtime PCR am Todestag (Tag 13-19) bestimmt (Abbildung 3.7). Die Bakterienlast war in der Milz ( $15444 \pm 2660$  Kopien/20ng DNS) am höchsten, gefolgt von Gehirn ( $3837 \pm 1119$  Kopien/20ng DNS), Lunge ( $613,9 \pm 127,4$  Kopien/20ng DNS) und Leber ( $250,9 \pm 94,4$  Kopien/20ng DNS). In BALB/c Mäusen lag die Bakterienlast in allen untersuchten Organen unter der Detektionsgrenze (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass *R. typhi* in der immundefizienten CB17 SCID Maus unkontrolliert in alle Organe disseminiert.

### 3 Ergebnisse



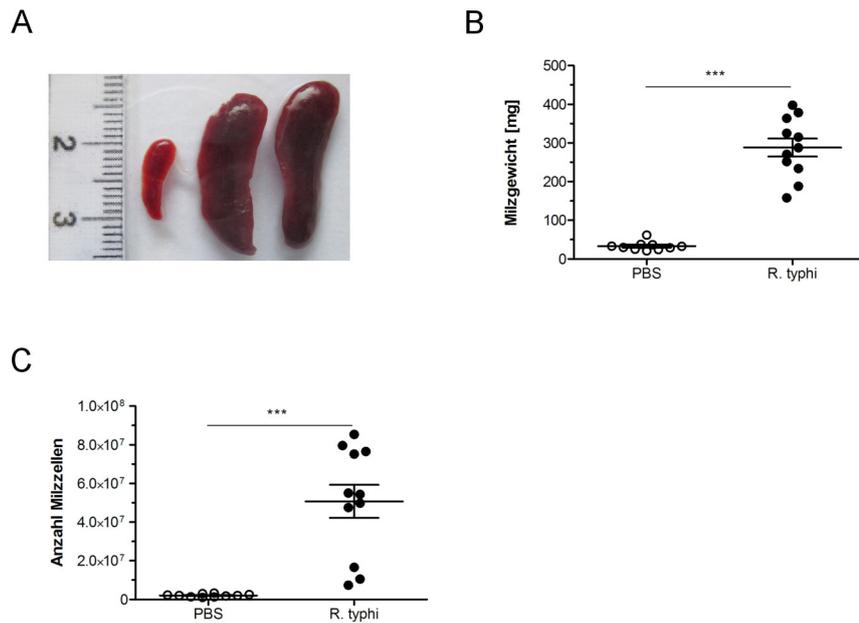
**Abbildung 3.7: CB17 SCID Mäuse entwickeln eine hohe Bakterienlast infolge einer *R. typhi*-Infektion.** CB17 SCID Mäuse wurden s.c. in die Schwanzwurzel mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* infiziert oder als Kontrolle mit PBS behandelt. Die Bestimmung der Bakterienlast in Leber, Milz, Gehirn und Lunge erfolgte in Duplikaten mittels *PrsA real-time* PCR zum Todeszeitpunkt der Mäuse (Tag 13-19) in 20 ng Gewebe-DNS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei unabhängigen Experimenten ( $n = 10-11$ ).

#### 3.1.2.3 Pathologie *R. typhi*-infizierter BALB/c und CB17 SCID Mäuse

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der schwere und tödliche Verlauf einer *R. typhi*-Infektion in CB17 SCID Mäusen mit pathologischen Veränderungen der Organe assoziiert ist. Es wurde bereits gezeigt, dass *R. typhi* unkontrolliert in alle Organe infizierter CB17 SCID Mäuse disseminiert (Abbildung 3.7). Obwohl CB17 SCID Mäuse eine hohe Bakterienlast im Gehirn aufwiesen, wurden keine neurologischen Symptome beobachtet. Vielmehr zeigte die Sektion der Mäuse zum Todeszeitpunkt in erster Linie zwei offensichtliche pathologische Veränderungen: zum einen die Entwicklung einer Splenomegalie und zum anderen eine deutliche Lebernekrose. Diese Beobachtungen werden im Folgenden näher beschrieben.

##### 3.1.2.3.1 *R. typhi*-infizierte CB17 SCID Mäuse entwickeln eine Splenomegalie

*R. typhi*-infizierte CB17 SCID Mäuse wiesen im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen eine stark vergrößerte Milz zum Todeszeitpunkt auf (Abbildung 3.8, A). Das Milzgewicht (Abbildung 3.8, B) und die Milzzellzahl (Abbildung 3.8, C) waren signifikant in *R. typhi*-infizierten CB17 SCID gegenüber PBS-behandelten Kontrollmäusen erhöht. Das Milzgewicht stieg von durchschnittlich  $33,1 \pm 2,6$  mg in PBS-behandelten Mäusen auf  $288,2 \pm 23,3$  mg ( $p = 0,0001$ ) in infizierten Mäusen. Die Zunahme der Milzzellzahl betrug im Durchschnitt das 25-fache und lag zum Zeitpunkt des Todes bei  $5,073 \times 10^7$  ( $p < 0,0001$ ). In BALB/c Mäusen waren zu keinem Zeitpunkt während der Infektion eine vergrößerte Milz und eine erhöhte Milzzellzahl detektierbar (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.8:** *R. typhi*-infizierte CB17 SCID Mäuse entwickeln eine Splenomegalie. Die Infektion von CB17 SCID Mäusen (schwarze Symbole,  $n = 10-11$ ) erfolgte s.c. in die Schwanzwurzel mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi*. (A) Gezeigt ist eine repräsentative Fotografie von Milzen einer PBS-behandelten Kontrollmaus (links) und zweier *R. typhi*-infizierter Mäuse (rechts). Das Milzgewicht (B) sowie die Anzahl der Milzzellen (C) wurden zum Zeitpunkt des Todes (Tag 13-19) ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse wurde mittels Zweistichproben-t-Test (B) und Mann-Whitney-U-Test (C) nach D'Agostino und Pearson omnibus Test auf Normalverteilung durchgeführt (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

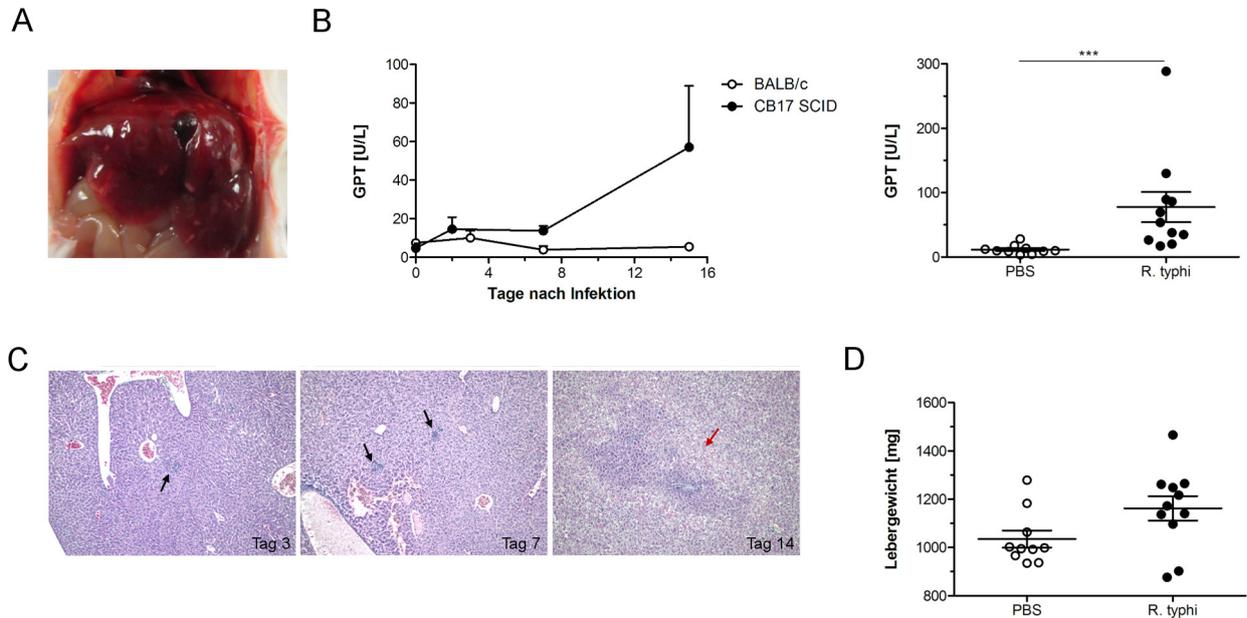
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Infektion mit *R. typhi* zu der Entwicklung einer Splenomegalie in immundefizienten CB17 SCID, aber nicht in Wildtyp BALB/c Mäusen, führt.

### 3.1.2.3.2 *R. typhi*-infizierte CB17 SCID Mäuse entwickeln einen schweren Leberschaden

Neben der Splenomegalie zeigten CB17 SCID Mäuse auffällige pathologische Veränderungen der Leber, obwohl dieses Organ die geringste Erregerlast aufwies (Abbildung 3.7). Bereits makroskopisch waren viele nekrotische Areale zu erkennen, und die Gallenblase besaß eine dunkle Färbung (Abbildung 3.9, A). Um eine Aussage über die Leberschädigung in den Mäusen zu treffen, wurden GPT-Werte im Serum von BALB/c und CB17 SCID Mäusen über den Infektionsverlauf gemessen (Abbildung 3.9, B links). BALB/c Mäuse wiesen zu keinem Zeitpunkt während der Infektion eine Erhöhung der GPT-Werte auf ( $p = 0,2498$ ). Im Gegensatz dazu stiegen die Leberwerte von CB17 SCID Mäusen, wenn auch nicht signifikant ( $p = 0,0583$ ), ab Tag 7 an und erreichten einen Wert von  $57,17 \pm 31,8$  U/L an Tag 15 nach Infektion. Zum Zeitpunkt des Todes waren die GPT-Werte signifikant auf  $77,6 \pm 23,6$  U/L angestiegen ( $p = 0,0004$ ) (Abbildung 3.9, B rechts). Für die nähere Untersuchung der Leberpathologie wurden histologische Schnitte infizierter CB17 SCID Mäuse über den Infektionsverlauf an Tag 3, 7 und 14 angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (Abbildung 3.9, C). Im Verlauf der Infektion waren zunehmend zelluläre Infiltrationen und die Entwicklung

### 3 Ergebnisse

nekrotischer Areale zu erkennen. Zum Ende der Infektion (ab Tag 14) waren im Lebergewebe nekrotische Bereiche detektierbar. Zusätzlich wurde das Lebergewicht von CB17 SCID Mäusen bestimmt (Abbildung 3.9, D). Das Lebergewicht stieg tendenziell von  $1035 \pm 111,7$  mg in PBS-behandelten auf  $1162 \pm 166,8$  mg in infizierten Mäusen an ( $p = 0,1131$ ).



**Abbildung 3.9: *R. typhi*-infizierte CB17 SCID Mäuse entwickeln einem schweren Leberschaden.** CB17 SCID Mäuse wurden s.c. in die Schwanzwurzel mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* infiziert. (A) Gezeigt ist eine repräsentative Fotografie der Leber einer *R. typhi*-infizierten Maus an Tag 17 nach Infektion. (B) Die GPT-Werte wurden im Serum von BALB/c (weiße Symbole,  $n = 6-8$ ) und CB17 SCID Mäusen (schwarze Symbole,  $n = 6-8$ ) zu den genannten Zeitpunkten (links) sowie in CB17 SCID Mäusen zum Todeszeitpunkt von *R. typhi*-infizierten (schwarze Symbole,  $n = 11$ ) im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen (weiße Symbole,  $n = 10$ ) (rechts) ermittelt. Gezeigt sind Daten zweier unabhängiger Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis-Test* und anschließendem *Dunns Posttest* (links, *ns*) bzw. mittels *Mann-Whitney-U-Test* nach *D'Agostino und Pearson omnibus Test* auf Normalverteilung (rechts,  $*** p \leq 0,001$ ). (C) Repräsentative Aufnahmen histologischer Schnitte der Leber wurden mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Färbung der Leberschnitte *R. typhi*-infizierter Mäuse erfolgte zu den genannten Zeitpunkten mit HE. Schwarze Pfeile deuten auf zelluläre Infiltrate hin. Ab Tag 14 waren die ersten nekrotischen Veränderungen erkennbar (roter Pfeil). (D) Das Lebergewicht von PBS-behandelten (weiße Symbole  $n = 10$ ) und *R. typhi*-infizierten (schwarze Symbole,  $n = 11$ ) Mäusen wurde zum Zeitpunkt des Todes ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Mann-Whitney-U-Test* und *Zweistichproben-t-Test* nach *D'Agostino und Pearson omnibus Test* auf Normalverteilung (*ns*).

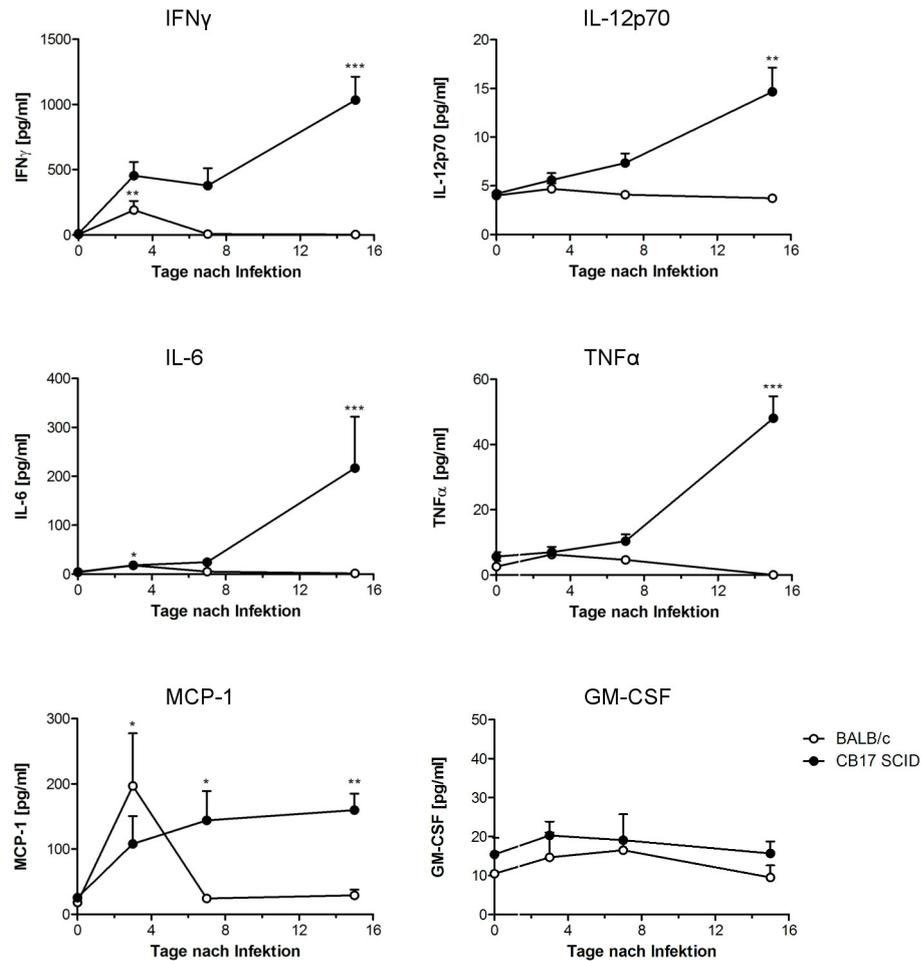
Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass CB17 SCID Mäuse infolge einer *R. typhi*-Infektion einen schweren Leberschaden entwickeln, der sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch nachweisbar ist. Eine Schädigung der Leberzellen zeigte sich darüber hinaus auch in einem signifikanten Anstieg der Serum-GPT-Konzentration.

## 3.2 Immunantwort gegen *R. typhi* in BALB/c und CB17 SCID Mäusen

### 3.2.1 *R. typhi*-infizierte CB17 SCID Mäuse entwickeln eine starke systemische Inflammation

Um erste Hinweise auf die Immunantwort nach *R. typhi*-Infektion in den Mäusen des BALB/c Stammes zu erhalten, wurde zunächst die systemische Zytokinproduktion in BALB/c sowie CB17 SCID Mäusen bestimmt. Hierfür wurde an Tag 3, 7 und 15 von *R. typhi*-infizierten sowie von PBS-behandelten Mäusen (Tag 0) die Zytokinfreisetzung im Plasma mittels *LEGENDplex* Assay ermittelt (Abbildung 3.10). Wie zuvor in Mäusen des C57BL/6 Stammes beobachtet, zeigten BALB/c Mäuse bereits an Tag 3 Höchstwerte von  $\text{IFN}\gamma$  ( $190,6 \pm 70,2$  pg/ml). Darüber hinaus waren in BALB/c Mäusen signifikant erhöhte Mengen von IL-6 ( $17,7 \pm 7,0$  pg/ml) und MCP-1 ( $196,8 \pm 80,7$  pg/ml) zu diesem Zeitpunkt messbar. Diese Zytokine waren an Tag 7 bereits wieder auf das Ausgangsniveau abgesunken. Ein Anstieg der  $\text{TNF}\alpha$ - und auch IL12-p70-Sekretion konnte zu keinem Zeitpunkt während der Infektion in BALB/c Mäusen detektiert werden.  $\text{IFN}\gamma$  dominierte das Zytokinprofil sowohl in BALB/c als auch CB17 SCID Mäusen. Im Gegensatz zu BALB/c Mäusen war ein steter Anstieg der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in CB17 SCID Mäusen über den Infektionsverlauf detektierbar und erreichte den Höchstwert an Tag 15 kurz vor dem Tod ( $1034,1 \pm 179,5$  pg/ml). Darüber hinaus konnten signifikant hohe Mengen von IL-12p70 ( $14,7 \pm 2,5$ ), IL-6 ( $216,8 \pm 105,0$ ),  $\text{TNF}\alpha$  ( $48,1 \pm 6,7$  pg/ml) und MCP-1 ( $159,9 \pm 24,2$ ) an Tag 15 gemessen werden. Die Konzentration von GM-CSF war in keinem der beiden Mausstämme erhöht.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.10: CB17 SCID Mäuse entwickeln eine starke systemische Inflammation während einer *R. typhi*-Infektion.** BALB/c (weiße Symbole, n = 5-8) und CB17 SCID Mäuse (schwarze Symbole, n = 5-8) wurden mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* s.c. in die Schwanzwurzel infiziert. Die systemische Zytokinproduktion wurde mittels *LEGENDplex* Assay im Plasma der Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Gezeigt sind Daten zweier unabhängiger Experimente. Für die statistische Auswertung wurden die Zytokinkonzentrationen mittels *Kruskal-Wallis-Test* und anschließendem *Dunns Posttest* analysiert (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

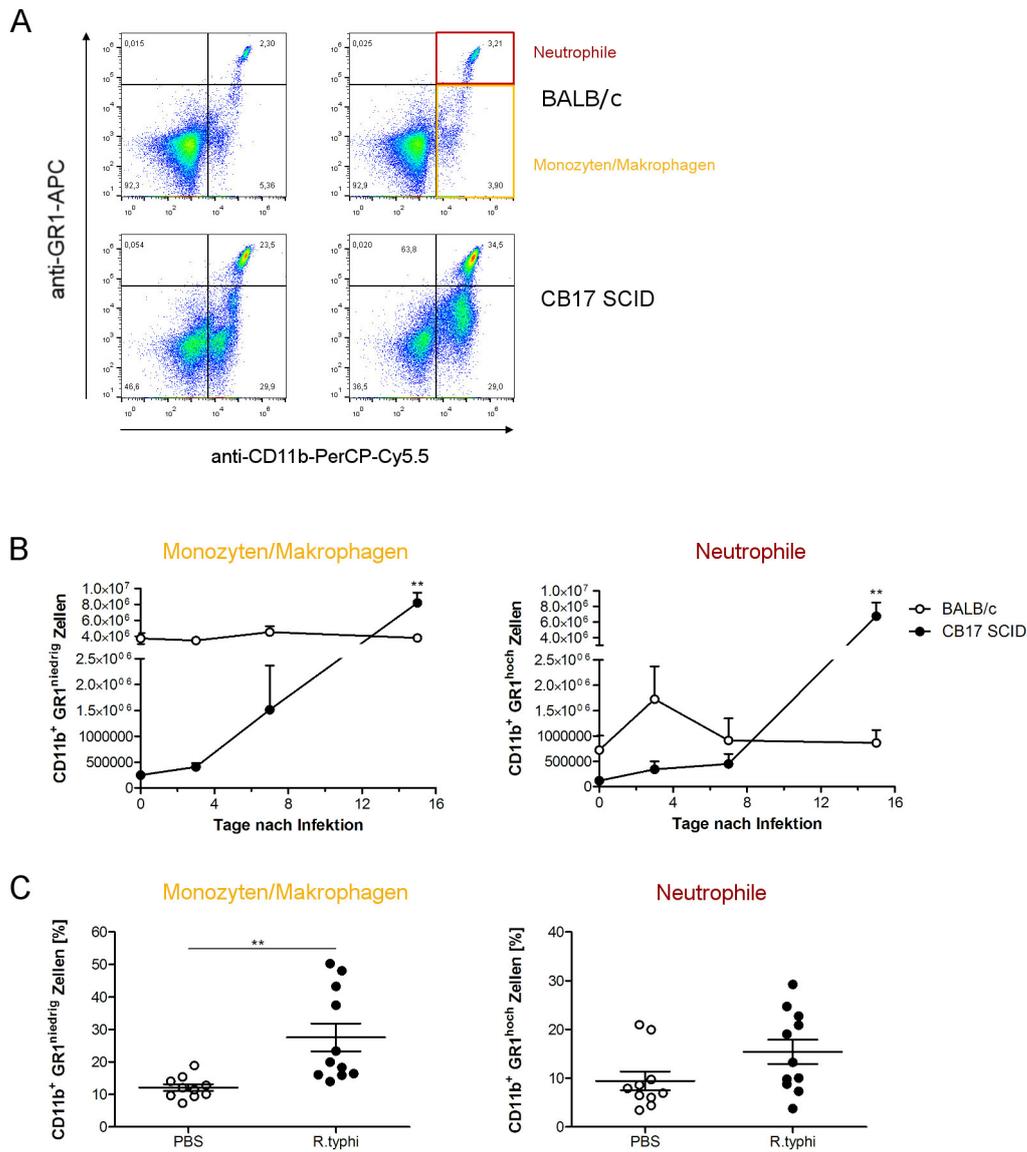
#### 3.2.2 Die Splenomegalie ist auf die Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen zurückzuführen

Die in CB17 SCID Mäusen beobachtete Splenomegalie deutet auf eine starke Immunantwort als Reaktion auf die Infektion mit *R. typhi* in diesen Mäusen hin. Um die Zellpopulationen zu identifizieren, die für die Entwicklung der Splenomegalie verantwortlich sind, wurde die Zellkomposition in der Milz über den Infektionsverlauf an Tag 3, 7 und 15 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrollgruppe dienten PBS-behandelte CB17 SCID Mäuse (Tag 0). Abbildung 3.11, A zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Analyse von BALB/c und CB17 SCID Milzzellen. Die Färbung der Oberflächenmoleküle CD11b und GR1 erlaubt die Differenzierung zwischen CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen und CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophilen [133]. Die Infektion von

### 3 Ergebnisse

BALB/c Mäusen führte zu keinem Anstieg der Monozyten/Makrophagen über den Infektionsverlauf (Abbildung 3.11, B). Hingegen zeigten diese Mäuse tendenziell eine Zunahme der Neutrophilen bis Tag 3 von  $7,22 \times 10^5$  auf  $1,73 \times 10^6$ . Im Gegensatz dazu wiesen CB17 SCID Mäuse einen signifikanten Anstieg der Monozyten/Makrophagen ( $p = 0,0024$ ) und Neutrophilen ( $p = 0,0039$ ) bis Tag 15 auf. Monozyten/Makrophagen nahmen dabei über den Verlauf der Infektion um etwa das 33-fache von  $2,5 \times 10^5$  auf  $8,2 \times 10^6$  zu. Ein noch stärkerer Anstieg wurde für die Neutrophilen beobachtet. Diese Zellen wiesen einen Anstieg um das etwa 53-fache von  $1,18 \times 10^5$  auf  $6,74 \times 10^6$  auf. Zum Todeszeitpunkt der Mäuse wurde zusätzlich die Frequenz von Monozyten/Makrophagen sowie Neutrophilen in der Milz von CB17 SCID Mäusen analysiert (Abbildung 3.11, C). Der Anteil von Monozyten/Makrophagen stieg dabei signifikant von  $12,1 \pm 1,1$  % in PBS-behandelten Mäusen auf  $27,6 \pm 4,3$  % in *R. typhi*-infizierten Mäusen ( $p = 0,0034$ ). Auch die Frequenz der Neutrophilen stieg deutlich, wenn auch nicht signifikant, von  $9,5 \pm 1,9$  % auf  $15,4 \pm 2,5$  % ( $p = 0,0776$ ) an.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.11: Die Entwicklung der Splenomegalie in CB17 SCID Mäusen wird durch eine Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen verursacht.** Die Infektion von BALB/c und CB17 SCID Mäusen erfolgte mit  $1 \times 10^8$  Bakterien s.c. in die Schwanzwurzel. **(A)** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen durchflusszytometrischer Analysen von Milzzellen einer PBS-behandelten Maus an Tag 15 nach Infektion (rechts) nach Färbung mit einem CD11b-PerCP-Cy5.5 (x-Achse) und GR1-APC AK (y-Achse). CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophile (rot) werden von CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen (orange) unterschieden. **(B)** Dargestellt sind absolute Zahlen CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen (links) sowie CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophilen (rechts) zu den gezeigten Zeitpunkten in der Milz von BALB/c (weiße Symbole, n = 5-7) und CB17 SCID Mäusen (schwarze Symbole, n = 5-6). Daten wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt und sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Kruskal-Wallis-Test* und anschließendem *Dunns Posttest* (\*\*  $p \leq 0,01$ ) **(C)** Zum Zeitpunkt des Todes wurden die prozentualen Anteile von CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen (links) sowie CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophilen (rechts) in der Milz von PBS-behandelten (weiße Symbole, n = 10) und *R. typhi*-infizierten (schwarze Symbole, n = 11) CB17 SCID Mäusen ermittelt. Gezeigt sind die Daten einzelner Mäuse sowie Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse wurde mittels *Zweistichproben-t-Test* nach *D'Agostino und Pearson omnibus Test* auf Normalverteilung durchgeführt (\*\*  $p \leq 0,01$ ).

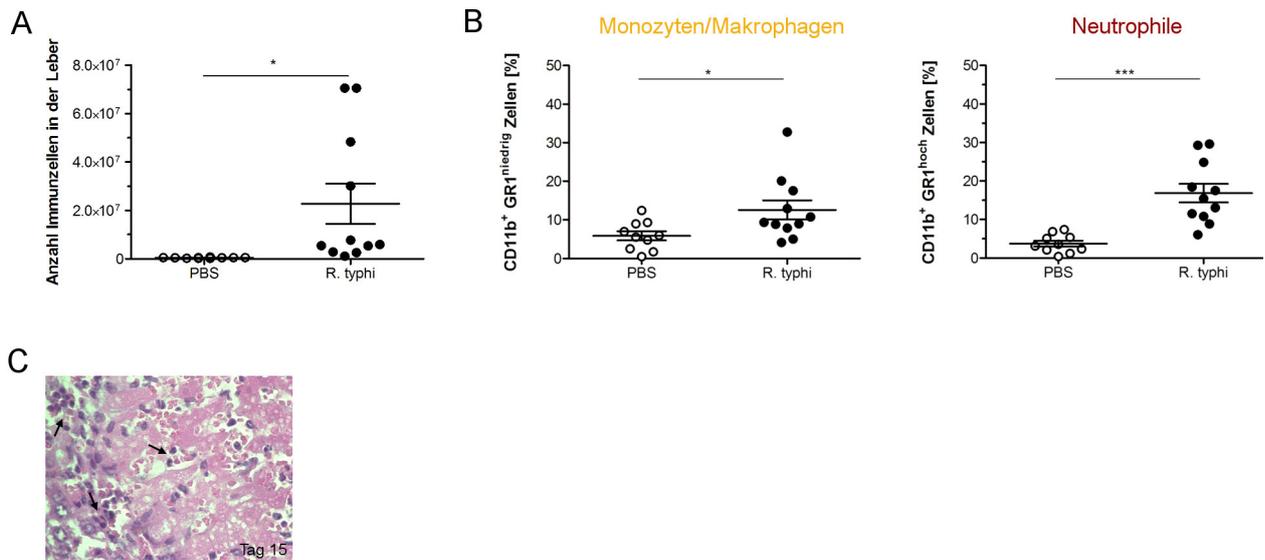
Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Splenomegalie hauptsächlich durch die Akkumula-

tion von Monozyten/Makrophagen sowie Neutrophilen verursacht wird.

#### 3.2.3 Monozyten/Makrophagen und Neutrophile infiltrieren die Leber

In der histologischen Analyse von Lebern *R. typhi*-infizierter CB17 SCID Mäuse wurden zelluläre Infiltrate beobachtet (Abbildung 3.9, C). Um die Infiltration von Immunzellen in die Leber genauer zu untersuchen, wurde deren Anzahl in der Leber von CB17 SCID Mäusen bestimmt (Abbildung 3.12, A). Dabei wiesen die Lebern infizierter CB17 SCID Mäuse eine signifikant erhöhte Zahl an Immunzellen auf, die durchschnittlich um das 54-fache auf  $2,275 \times 10^7$  ( $p = 0,0197$ ) anstieg. Im Folgenden sollte eine Analyse der zellulären Komposition Aufschluss darüber geben, welche Zellen in die Leber infiltrieren. Hierfür wurden Immunzellen in der Leber von PBS-behandelten und *R. typhi*-infizierten CB17 SCID Mäusen durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden zum Todeszeitpunkt isoliert und mit einem fluoreszenzmarkierten CD11b sowie GR1 (Ly-6G und Ly-6C) AK analog der Milzzellanalyse (Abbildung 3.11, A unten) gefärbt, um die Monozyten/Makrophagen ( $CD11b^+ GR1^{\text{niedrig}}$ ) von Neutrophilen ( $CD11b^+ GR1^{\text{hoch}}$ ) zu differenzieren. Gegenüber PBS-behandelten CB17 SCID Mäusen ( $5,9 \pm 1,2$  %) stieg die Anzahl von Monozyten/Makrophagen in infizierten Mäusen ( $12,6 \pm 2,5$  %) signifikant an ( $p = 0,0265$ ) (Abbildung 3.12, B links). Eine noch stärkere Zunahme war bei Neutrophilen zu finden. Die Frequenz dieser Zellen nahm von  $3,7 \pm 0,8$  % auf  $16,9 \pm 2,4$  % infolge der *R. typhi*-Infektion signifikant zu ( $p < 0,0001$ ) (Abbildung 3.12, B rechts). Diese Beobachtungen wurde durch HE-Färbung histologischer Leberschnitte infizierter CB17 SCID Mäuse bestätigt (Abbildung 3.12, C). Es sind deutlich infiltrierende polymorphnukleäre Zellen im Lebergewebe an Tag 15 nach Infektion zu erkennen.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.12: Die Leber von *R. typhi*-infizierten CB17 SCID Mäusen wird von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen infiltriert.** CB17 SCID Mäuse wurden mit  $1 \times 10^8$  Bakterien s.c. in die Schwanzwurzel infiziert. **(A)** Die Anzahl an Immunzellen in der Leber von PBS-behandelten (weiße Symbole  $n = 10$ ) und *R. typhi*-infizierten (schwarze Symbole,  $n = 11$ ) Mäusen wurde zum Zeitpunkt des Todes ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test nach *D'Agostino und Pearson omnibus Test* auf Normalverteilung ( $* p \leq 0,05$ ). **(B)** Zum Zeitpunkt des Todes wurden die prozentualen Anteile von CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen (links) sowie CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophilen (rechts) in der Leber von PBS-behandelten (weiße Symbole,  $n = 10$ ) und *R. typhi*-infizierten (schwarze Symbole,  $n = 11$ ) Mäusen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dargestellt sind die Daten einzelner Mäuse sowie Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Mann-Whitney-U-Test* (links,  $* p \leq 0,05$ ) und *Zweistichproben-t-Test* nach *D'Agostino und Pearson omnibus Test* auf Normalverteilung (rechts,  $*** p \leq 0,001$ ). **(C)** Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme eines histologischen Schnittes der Leber einer *R. typhi*-infizierten Maus bei 40-facher Vergrößerung. Die Färbung des Leberpräparats erfolgte mit HE an Tag 15 nach Infektion.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Monozyten/Makrophagen als auch Neutrophile die Leber *R. typhi*-infizierter CB17 SCID Mäuse infiltrieren.

### 3.3 Funktionelle Charakterisierung von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen in CB17 SCID Mäusen

In der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass sowohl Makrophagen als auch Neutrophile an der Entwicklung einer Splenomegalie (Kapitel 3.2.2) in CB17 SCID Mäusen beteiligt sind sowie deren Leber infiltrieren (Kapitel 3.2.3). Im Folgenden sollte die Funktion dieser beiden Zellpopulationen während einer *R. typhi*-Infektion näher untersucht werden. Sowohl Makrophagen als auch Neutrophile gehören zu den Phagozyten und bilden als Teil der angeborenen Immunantwort eine erste Barriere gegen eindringende Bakterien. Um die Funktion von Makrophagen und Neutrophilen während einer *R. typhi*-Infektion in CB17 SCID Mäusen näher zu charakterisieren, wurden Milz- und Leberzellen

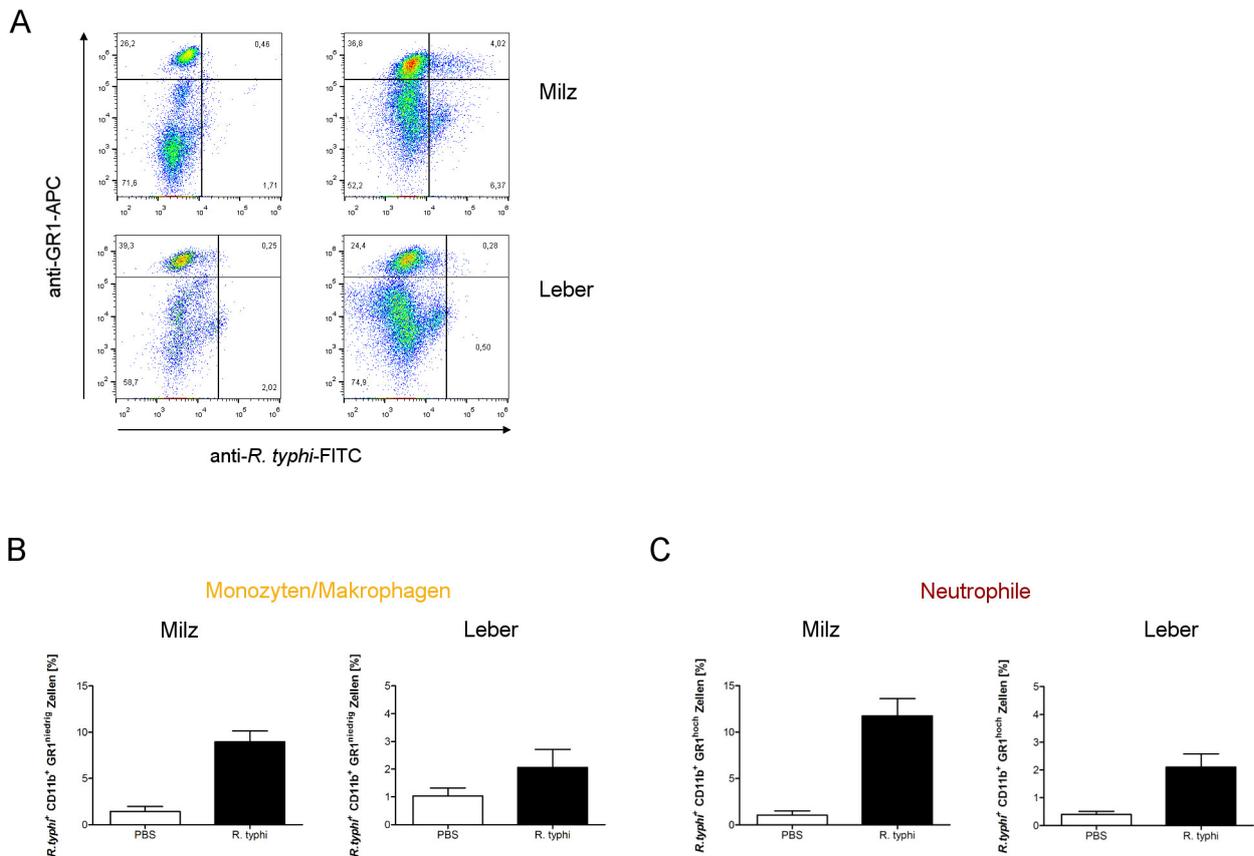
im Folgenden zum einen auf die Phagozytose von *R. typhi* und zum anderen auf Aktivierung wie die Freisetzung bakterizider Substanzen wie NO und ROS sowie Zytokinen untersucht.

#### 3.3.1 Monozyten/Makrophagen und Neutrophile nehmen *R. typhi in vivo* auf

Um die Aufnahme von *R. typhi* durch Monozyten/Makrophagen und Neutrophile zu untersuchen, wurden Milz- und Leberzellen PBS-behandelter und *R. typhi*-infizierter CB17 SCID Mäuse am Todestag mit fluoreszenzmarkierten CD11b und GR1 AK gefärbt, um Neutrophile von Monozyten/Makrophagen zu differenzieren [133]. Zusätzlich erfolgte die Färbung mit einem *R. typhi*-spezifischen monoklonalen AK (anti-*R. typhi* #BNITM). Abbildung 3.13, A zeigt eine exemplarische Färbung von CD11b<sup>+</sup> Milz- und Leberzellen mit einem anti-GR1 und anti-*R. typhi* AK. Es wurde auf diese Weise die Frequenz *R. typhi*<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen und Neutrophiler in der Milz und Leber ermittelt (Abbildung 3.13, B und C). Die Aufnahme von *R. typhi* konnte in CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen sowohl in der Milz als auch in der Leber nachgewiesen werden (Abbildung 3.13, B). Der prozentuale Anteil der *R. typhi*<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen lag in der Milz bei  $9,0 \pm 1,2$  % und in der Leber bei  $2,1 \pm 0,7$  %. Damit war die Frequenz der *R. typhi*<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen in der Milz deutlich höher als in der Leber. Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Phagozytose von *R. typhi* durch CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophile (Abbildung 3.13, C). Sowohl in Neutrophilen der Milz als auch der Leber war *R. typhi* nachweisbar. Die Frequenz *R. typhi*<sup>+</sup> Neutrophiler in der Milz war mit  $11,8 \pm 1,9$  % höher als die in der Leber, welche bei  $2,1 \pm 0,5$  % lag.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *R. typhi* sowohl von Monozyten/Makrophagen als auch Neutrophilen in den betroffenen Organen aufgenommen wird.

### 3 Ergebnisse



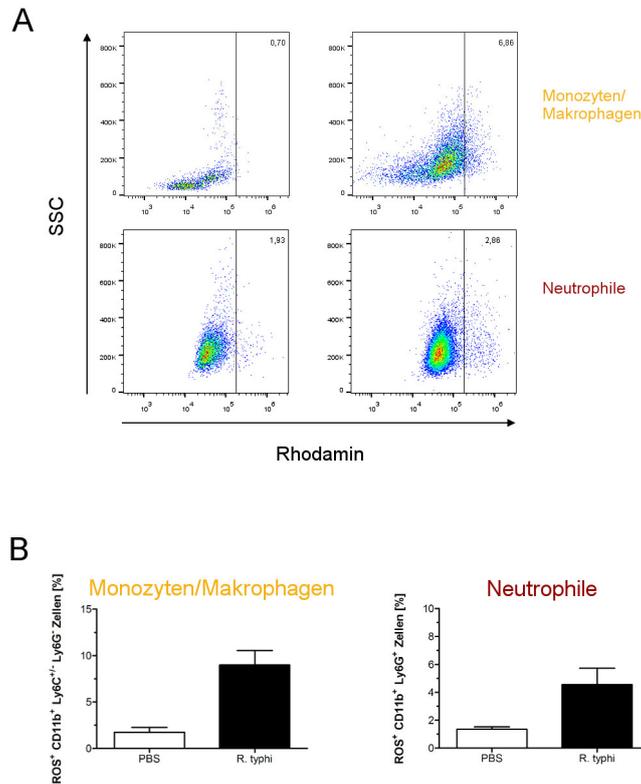
**Abbildung 3.13: Makrophagen und Neutrophile in der Milz und Leber phagozytieren *R. typhi* in vivo.** CB17 SCID Mäuse wurden mit  $1 \times 10^8$  Bakterien s.c. in die Schwanzwurzel infiziert und Milz- sowie Leberzellen durchflusszytometrisch zum Todeszeitpunkt analysiert. Kontrollmäuse wurden mit PBS behandelt. **(A)** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen durchflusszytometrischer Analysen von CD11b-positiven Milz- und Leberzellen einer PBS-behandelten (links) sowie einer *R. typhi*-infizierten (rechts) Maus nach Färbung mit einem anti-*R. typhi* (x-Achse) und GR1 AK (y-Achse). **(B)** Die Diagramme fassen die Frequenz *R. typhi*<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen in der Milz (links) und Leber (rechts) zusammen. **(C)** Gezeigt ist der prozentuale Anteil *R. typhi*<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophiler in der Milz (links) und Leber (rechts). Die Mittelwerte  $\pm$  SEM zweier unabhängiger Experimente von PBS-behandelten (n = 10) und *R. typhi*-infizierten (n = 11) Mäusen sind dargestellt.

#### 3.3.2 Monozyten/Makrophagen und Neutrophile zeigen einen aktivierten Phänotyp

Neben der Phagozytose werden Monozyten/Makrophagen und Neutrophile durch den Kontakt mit eindringenden Erregern aktiviert. Deshalb wurde im Folgenden der antibakterielle Aktivierungsstatus von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen während der *R. typhi*-Infektion genauer charakterisiert. Zunächst erfolgte eine Analyse der ROS-Produktion. Blutzellen PBS-behandelter und *R. typhi*-infizierter Mäuse wurden zum Zeitpunkt des Todes mit fluoreszenzmarkierten CD11b, Ly-6C und Ly-6G AK inkubiert, um CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+/-</sup> Ly-6G<sup>-</sup> Monozyten/ Makrophagen von CD11b<sup>+</sup> Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen zu differenzieren. Folgend wurden die Zellen mit Dihydrorhodamin (DHR) inkubiert, welches in der Anwesenheit von ROS zu Rhodamin oxidiert wird und durchflusszytometrisch als Rhodamin messbar ist. Abbildung 3.14, A zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Analyse der ROS-Freisetzung von Monozyten/Makrophagen sowie Neutrophilen. Zum Todeszeitpunkt der Mäuse

### 3 Ergebnisse

setzten  $9,0 \pm 1,6$  % der untersuchten Monozyten/Makrophagen im Blut ROS frei und zeigten damit einen aktivierten Phänotyp (Abbildung 3.14, B links). Der prozentuale Anteil ROS-freisetzender Neutrophile im Blut war im Vergleich geringer (Abbildung 3.14, B rechts).  $4,5 \pm 1,2$  % der Neutrophilen infizierter Mäuse wiesen einen aktivierten Phänotyp auf und produzierten ROS.

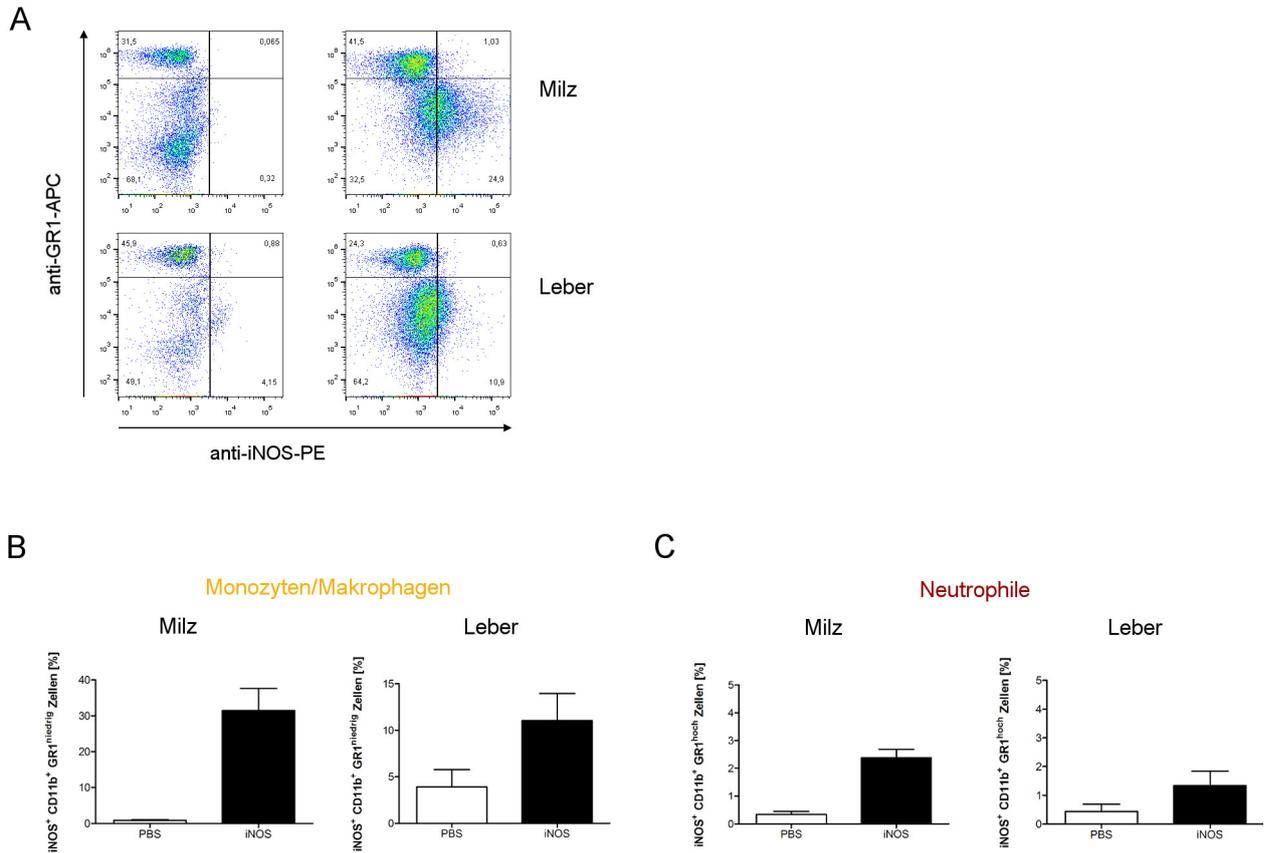


**Abbildung 3.14: Monozyten/Makrophagen und Neutrophile im Blut setzen ROS nach *R. typhi*-Infektion frei.** CB17 SCID Mäuse wurden mit  $1 \times 10^8$  Bakterien s.c. in die Schwanzwurzel infiziert und Blutzellen durchflusszytometrisch zum Todeszeitpunkt analysiert. **(A)** Aufnahmen repräsentativer durchflusszytometrischer Analysen von  $CD11b^+$   $Ly-6C^{+/-}$   $Ly-6G^+$  Monozyten/Makrophagen (oben) und  $CD11b^+$   $Ly-6G^+$  Neutrophilen (unten) einer PBS-behandelten (links) sowie einer *R. typhi*-infizierten (rechts) Maus nach Färbung mit Dihydrorhodamin (x-Achse) sind gezeigt. **(B)** Die Diagramme stellen die Frequenz ROS-positiver  $CD11b^+$   $Ly-6C^{+/-}$   $Ly-6G^+$  Monozyten/Makrophagen (links) und  $CD11b^+$   $Ly-6G^+$  Neutrophilen (rechts) von PBS-behandelten ( $n = 10$ ) und *R. typhi*-infizierten ( $n = 11$ ) Mäusen zum Zeitpunkt des Todes dar. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM zweier unabhängiger Experimente.

Der antibakterielle Aktivierungsstatus der Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen wurde zudem in der Milz und Leber anhand der iNOS-Expression überprüft. Hierfür wurde die Expression von iNOS innerhalb der Zellen durchflusszytometrisch zum Zeitpunkt des Todes der Mäuse analysiert. Zunächst erfolgte die Färbung der Zellen mit fluoreszenzmarkierten AK gegen die Oberflächenmoleküle  $CD11b$  und  $GR1$ , um  $CD11b^+$   $GR1^{niedrig}$  Monozyten/Makrophagen von  $CD11b^+$   $GR1^{hoch}$  Neutrophilen zu unterscheiden [133]. Zusätzlich wurden die Zellen intrazellulär mit einem fluoreszenzmarkierten iNOS AK gefärbt. Abbildung 3.15, A zeigt exemplarisch eine solche Färbung von  $CD11b^+$  Milz- und Leberzellen. Monozyten/Makrophagen sowohl in der Milz als auch der Leber exprimierten iNOS nach Infektion (Abbildung 3.15, B). In der Milz stieg der prozentuale Anteil  $iNOS^+$  Monozyten/Makrophagen auf

### 3 Ergebnisse

31,5 ± 6,2 % gegenüber PBS-behandelten Kontrollmäusen (0,8 ± 0,2 %) an. In der Leber war der Anstieg der Frequenz iNOS<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen im Vergleich geringer, lag aber dennoch bei 11,1 ± 2,9 % in *R. typhi*-infizierten Mäusen. Die iNOS Expression der Neutrophilen sowohl in der Milz als auch der Leber in Folge einer *R. typhi*-Infektion war ebenfalls gesteigert. In der Milz exprimierten 2,4 ± 0,2 % und in der Leber von 1,3 ± 0,5 % der Neutrophilen iNOS<sup>+</sup>.

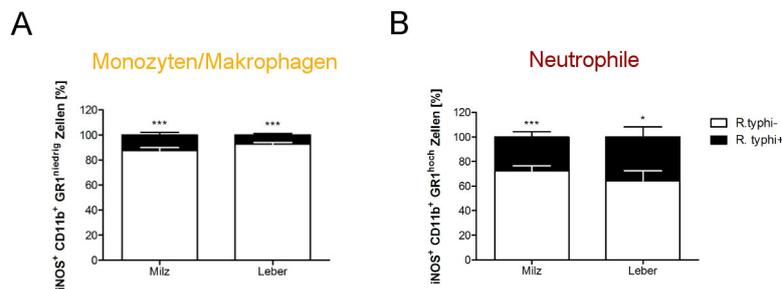


**Abbildung 3.15: Monozyten/Makrophagen und Neutrophile in der Milz und Leber exprimieren iNOS nach *R. typhi*-Infektion.** Die Infektion von CB17 SCID Mäuse erfolgte mit  $1 \times 10^8$  Bakterien s.c. in die Schwanzwurzel. Kontrollmäuse wurden mit PBS behandelt. Zum Zeitpunkt des Todes wurden Milz- sowie Leberzellen durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen durchflusszytometrischer Analysen von CD11b<sup>+</sup> Milz- und Leberzellen einer PBS-behandelten sowie einer *R. typhi*-infizierten (rechts) Maus nach Färbung mit einem iNOS- (x-Achse) und GR1-AK (y-Achse). **(B)** Dargestellt ist der prozentuale Anteil iNOS<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen in der Milz (links) und Leber (rechts). **(C)** Die Diagramme fassen die Frequenz iNOS<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophiler in der Milz (links) und Leber (rechts) zusammen. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ± SEM zweier unabhängiger Experimente von PBS-behandelten (n = 10) und *R. typhi*-infizierten (n = 11) Mäusen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Monozyten/Makrophagen als auch Neutrophile nicht nur *R. typhi* phagozytieren, sondern auch einen aktivierten antibakteriellen Phänotyp aufweisen.

### 3.3.3 Die Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen korreliert nicht mit der Phagozytose der Bakterien

Abschließend sollte überprüft werden, ob die Phagozytose der Bakterien direkt mit der Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen korreliert. Hierfür wurden iNOS-exprimierende  $CD11b^+ GR1^{niedrig}$  Monozyten/Makrophagen und  $CD11b^+ GR1^{hohe}$  Neutrophile auf den Gehalt an Bakterien analysiert (Abbildung 3.16). Überraschenderweise war die Frequenz der iNOS-Produzenten unter den Makrophagen/Monozyten, die keine detektierbaren Bakterienmengen phagozytiert hatten, wesentlich höher als unter denen, die *R. typhi* beinhalten. Dies war sowohl in der Milz ( $p < 0,0001$ ) als auch in der Leber ( $p = 0,0001$ ) zu beobachten. In der Milz lag der prozentuale Anteil der *R. typhi*<sup>-</sup> iNOS<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen bei  $87,7 \pm 2,3$  % und in der Leber bei  $92,8 \pm 1,3$  %, während lediglich etwa 10 % der *R. typhi*<sup>+</sup> Zellen iNOS exprimierten. Ein ähnliches Ergebnis, wenn auch weniger deutlich, war ebenfalls für die Neutrophilen zu beobachten. Es zeigte sich, dass signifikant mehr iNOS-exprimierende Neutrophile keine Bakterien phagozytiert hatten. In der Milz exprimierten  $72,3 \pm 4,1$  % der Neutrophilen iNOS ohne *R. typhi* aufgenommen zu haben ( $p = 0,0001$ ). In der Leber war der Anteil von iNOS-Produzenten unter den *R. typhi*<sup>-</sup> Zellen mit  $64,4 \pm 8,1$  % ebenfalls signifikant höher ( $p = 0,0220$ ) als unter denen, die *R. typhi* aufgenommen hatten.



**Abbildung 3.16: Monozyten/Makrophagen und Neutrophile zeigen unabhängig von der bakteriellen Aufnahme einen aktivierten Phänotyp.** Die Infektion von CB17 SCID Mäusen erfolgte mit  $1 \times 10^8$  Bakterien s.c. in die Schwanzwurzel. Zum Zeitpunkt des Todes wurden  $CD11b^+ GR1^{niedrig}$  Monozyten/Makrophagen (A) sowie  $CD11b^+ GR1^{hoch}$  Neutrophile (B) der Milz sowie der Leber durchflusszytometrisch analysiert und der prozentuale Anteil iNOS-positiver Zellen unter den *R. typhi*-negativen (weiß) oder -positiven (schwarz) Zellen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM zweier unabhängiger Experimente von *R. typhi*-infizierten ( $n = 10-11$ ) Mäusen. Die statistische Analyse wurde mittels Zweistichproben-t-Test nach *D'Agostino und Pearson omnibus* Test auf Normalverteilung durchgeführt (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

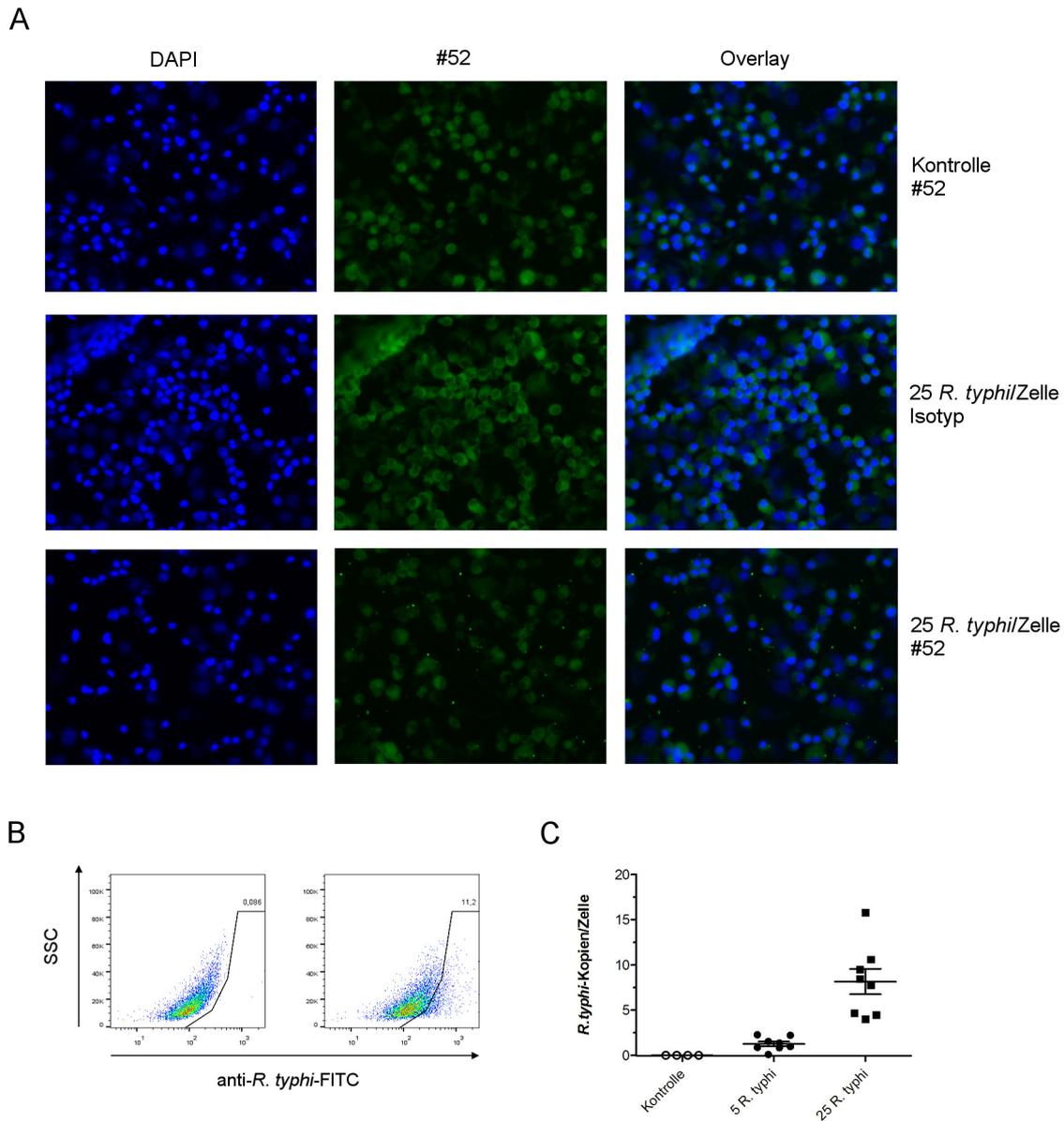
Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass sowohl Makrophagen als auch Neutrophile nach *R. typhi*-Infektion in CB17 SCID Mäusen das Pathogen in der Milz und der Leber phagozytieren. Darüber hinaus weisen diese Zellen einen aktivierten antibakteriellen Phänotyp auf. Dieser ist im Blut durch die Freisetzung von ROS und in der Milz sowie der Leber durch die Expression von iNOS charakterisiert. Überraschenderweise korreliert die Aktivierung dieser Zellen jedoch nicht mit der Phagozytose von *R. typhi*, sondern tritt hauptsächlich unabhängig von dieser auf.

### 3.3.4 Makrophagen reagieren *in vitro* nicht auf eine *R. typhi*-Infektion

Im vorangegangenen Abschnitt dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Monozyten/Makrophagen *in vivo* überraschenderweise nicht mit der Aufnahme der Bakterien korreliert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *R. typhi* von diesen Zellen nicht in klassischer Weise erkannt wird. In der Regel werden Makrophagen neben der Phagozytose über PRRs wie TLR aktiviert. TLR4 bspw. erkennt LPS, als Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien. Die Erkennung von Pathogenen durch diese Rezeptoren induziert die Aktivierung der Zelle und direkt die Expression proinflammatorischer Zytokine wie  $\text{IFN}\gamma$ , IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$  sowie von iNOS, MHC I und MHC II. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob Makrophagen direkt mit einer Aktivierung auf *R. typhi* reagieren. Hierfür wurden BALB/c Knochenmarksmakrophagen mit *R. typhi in vitro* infiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen entweder mit Medium oder LPS inkubiert. Zunächst wurde überprüft, ob Knochenmarksmakrophagen *R. typhi* phagozytieren. Hierfür wurden die Bakterien mittels Immunfluoreszenz und durchflusszytometrisch mit Hilfe eines spezifischen *R. typhi* AK detektiert sowie mittels *PrsA* realtime PCR bestimmt (Abbildung 3.17). Aus dem Knochenmark generierte Makrophagen phagozytierten *R. typhi*. In der Immunfluoreszenz ist *R. typhi* deutlich in Form hell-leuchtender grüner Punkte zu erkennen (Abbildung 3.17, A unten). Diese waren weder in nicht-infizierten Kontrollzellen noch in infizierten Zellen, die mit einem Isotyp AK gefärbt wurden, nachweisbar. Darüber hinaus waren im Durchflusszytometer nach 24 Stunden ca. 11 % der Zellen positiv für *R. typhi*. Die Analyse der Bakterienlast nach 24 Stunden mittels realtime PCR ergab, dass durchschnittlich  $1,3 \pm 0,3$  Kopien pro Zelle nach Infektion mit 5 Bakterien und  $8,1 \pm 1,4$  Kopien pro Zelle nach Infektion mit 25 Bakterien pro Zelle nachweisbar waren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *R. typhi* von Makrophagen *in vitro* phagozytiert wird. Es belegt zudem, dass eine hinreichend hohe Anzahl der Zellen Kontakt mit dem Erreger hatte, um weitere Analysen zur Aktivierung der Zellen durchzuführen.

### 3 Ergebnisse



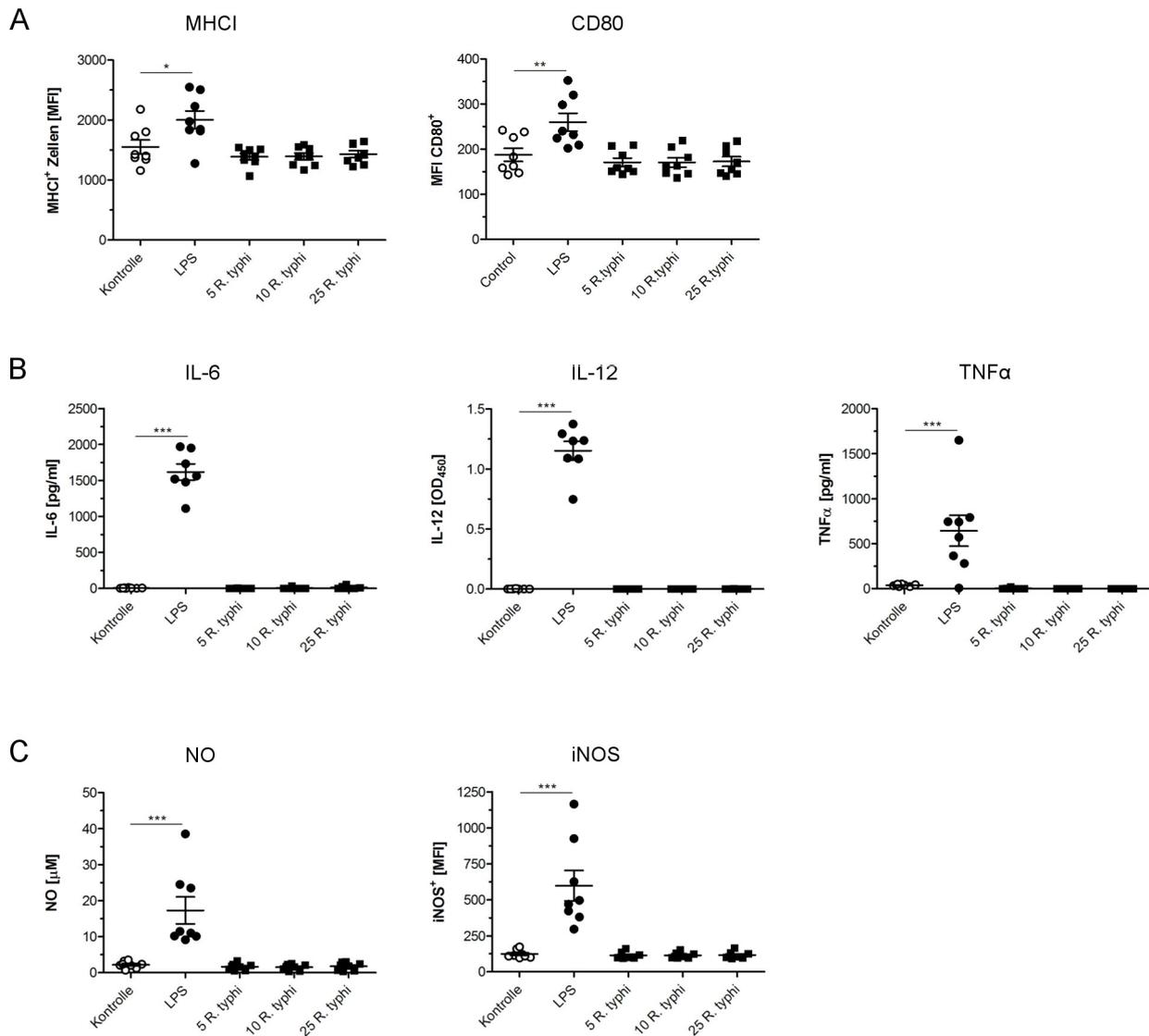
**Abbildung 3.17: Bestimmung der Bakterienlast nach *in vitro* Infektion von Knochenmarksmakrophagen.** Die Infektion von je  $5 \times 10^6$  BALB/c Knochenmarksmakrophagen erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bakterien (5 und 25 Kopien/Zelle). Kontrollzellen wurden entweder mit Medium oder LPS ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. **(A)** Immunfluoreszenzaufnahmen wurden 48 Stunden nach Infektion mit 25 Kopien/Zelle bei 40-facher Vergrößerung erstellt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). *R. typhi* wurde mit einem anti-*R. typhi* AK (#BNITM) sowie anti-Maus IgG3-FITC AK (grün) gefärbt. Als Isotypkontrolle wurde ein Maus IgG3 AK verwendet. **(B)** Gezeigt ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Makrophagen nach 24 Stunden Inkubation mit Medium (links) und 25 *R. typhi* pro Zelle (rechts). Die Zellen wurden zur Überprüfung der Infektion mit anti-*R. typhi*-AK (#BNITM) gefärbt. **(C)** Die Bakterienlast in den Makrophagen wurde zusätzlich mittels *PrsA* real-time PCR ermittelt. Kontrollzellen wurden mit Medium inkubiert. Dargestellt sind die Daten von Makrophagen einzelner Mäuse als Mittelwerte von Duplikaten  $\pm$  SEM.

Folgend wurde der Aktivierungsstatus der Zellen analysiert. Hierfür wurde die Expression der Oberflächenmoleküle MHCII und CD86 sowie die Freisetzung der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  in den

### 3 Ergebnisse

Überstand der Zellen gemessen. CD80 ist neben CD86 ein wichtiges kostimulatorisches Molekül, welches als Reaktion auf LPS über TLR-4 exprimiert wird. Zusammen mit mikrobiellen Ag, die über MHCI und MHCII auf Makrophagen präsentiert werden, sind diese essentiell für die Induktion der adaptiven Immunantwort. Die Stimulation der Makrophagen mit LPS führte erwartungsgemäß zu einer signifikant gesteigerten Expression von MHCI ( $p \leq 0,05$ ) und CD80 ( $p \leq 0,05$ ) auf den Zellen. Dagegen war sowohl die Expression von MHCI als auch CD80 unabhängig von der bakteriellen Konzentration in *R. typhi*-infizierten Makrophagen nicht erhöht. Die Analyse der Zytokinfreisetzung im Überstand der Makrophagen nach 24 Stunden ergab ein ähnliches Bild. Nach Stimulation mit LPS waren die Konzentrationen von IL-6 ( $p \leq 0,001$ ), IL-12 ( $p \leq 0,001$ ) und  $\text{TNF}\alpha$  ( $p \leq 0,001$ ) signifikant erhöht. Der Kontakt der Makrophagen mit *R. typhi* führte dagegen nicht zu der Freisetzung messbarer Zytokinkonzentrationen. Darüber hinaus erfolgte die Detektion von NO im Überstand sowie der Expressionsnachweis von iNOS als Indikator für die antibakterielle Aktivität der Makrophagen. Sowohl die Expression von iNOS ( $p \leq 0,001$ ) in den Zellen nach 24 Stunden als auch die Konzentration von NO ( $p \leq 0,001$ ) im Überstand der Zellen nach 48 Stunden war nach LPS-Stimulation signifikant erhöht. Die Inkubation von *R. typhi* mit Makrophagen führte, im Gegensatz zu der Stimulation mit LPS, nicht zu einer Expression von iNOS und einer Freisetzung von NO.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.18: Makrophagen zeigen nach *in vitro*-Infektion mit *R. typhi* keinen aktivierten Phänotyp.** Die Infektion der Zellen erfolgte mit unterschiedlichen Mengen von *R. typhi* (5, 10 und 25 Kopien/Zelle) (schwarze Quadrate). Kontrollzellen wurden entweder mit Medium (weiße Kreise) oder LPS (0,5 μg/ml, schwarze Kreise) inkubiert. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von Makrophagen nach durchflusszytometrischer Färbung von MHC1 und CD86 (A) sowie iNOS (C). Überstände infizierter Makrophagen wurden auf Freisetzung von IL-6, IL-12, TNFα mittels ELISA (B) und NO mittels Griess-Reaktion (C) analysiert. Jeder Punkt symbolisiert den Messwert von 50.000 Makrophagen einer Maus gemessen in Duplikaten. Dargestellt sind Daten aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der *One way ANOVA* (A und B, \*\*\*  $p < 0,001$ ) mit anschließendem *Tukey's* multifaktoriellem Vergleichstest (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ) oder *Kruskal-Wallis-Test* (C, \*\*\*  $p < 0,001$ ) und anschließendem *Dunns Posttest* (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ).

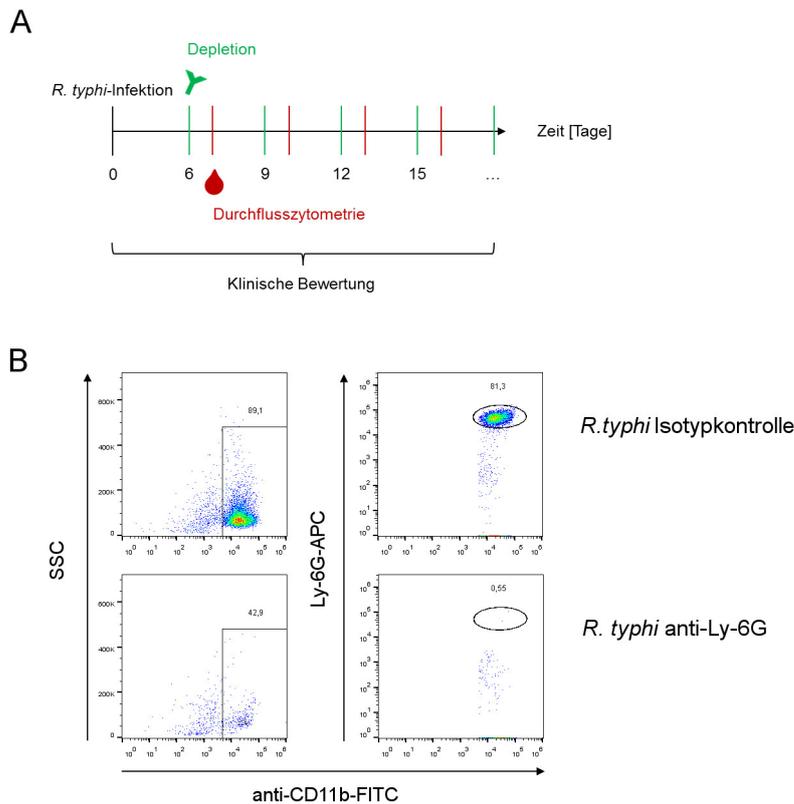
Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Knochenmarksmakrophagen *in vitro* *R. typhi* phagozytieren. Die Gegenwart der Bakterien führt jedoch nicht zu einer Aktivierung der Zellen und der Induktion antibakterieller Mechanismen. Demnach erkennen Makrophagen *R. typhi* nicht auf klassische Weise über TLR.

### 3.4 Die Rolle von Neutrophilen in der *R. typhi*-Infektion in CB17 SCID Mäusen

In der vorliegenden Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass Monozyten/Makrophagen und Neutrophile die Immunantwort in der Milz dominieren. Beide Zellpopulationen infiltrierten ebenfalls die Leber, die auffällige pathologische Veränderungen zeigte. Darüber hinaus wiesen sowohl Monozyten/Makrophagen als auch Neutrophile einen aktivierten Phänotyp auf, der durch die Expression von iNOS sowie der Freisetzung von NO und ROS gekennzeichnet war. Insbesondere Neutrophile haben in der Leber eine essentielle Rolle in der Bekämpfung eindringender Mikroorganismen, die über das Blut in das Organ gelangen. Dabei können sie jedoch eine Reihe von Gewebeschäden in der Leber durch Freisetzung antimikrobieller Substanzen wie ROS und NO verursachen [17, 28, 29].

Um zu klären, ob einwandernde Neutrophile während einer *R. typhi*-Infektion zum Leberschaden in der CB17 SCID Maus beitragen, wurden diese Zellen mit einem Ly-6G AK depletiert. Abbildung 3.19, A zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments. CB17 SCID Mäuse wurden hierfür mit *R. typhi* infiziert. Zusätzlich wurde in einem Rhythmus von 3 Tagen ab Tag 6 nach Infektion der Depletions-AK i.p. appliziert. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde mit einem klinischen Bewertungssystem beurteilt und die Überlebensrate bestimmt. Jeweils 1 Tag nach Depletion erfolgte eine durchflusszytometrische Überprüfung der Depletions-Effizienz des AK. 4 Mausgruppen wurden für dieses Experiment verwendet. Kontrollmäuse wurden ebenfalls infiziert, erhielten aber einen Ratte IgG2a Isotyp AK. Als interne Kontrollgruppen wurden CB17 SCID Mäuse mit PBS behandelt und entweder PBS i.p. injiziert oder der Depletions-AK appliziert, um einen Einfluss des AK auf den Infektionsverlauf auszuschließen. Abbildung 3.19, B zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Überprüfung der Depletion. Isotyp-behandelte Mäuse wiesen an Tag 8 nach Infektion 81,3 % Neutrophile im Blut auf. Im Vergleich dazu sank die Frequenz der Neutrophilen auf 0,55 % 1 Tag nach Depletion herab.

### 3 Ergebnisse

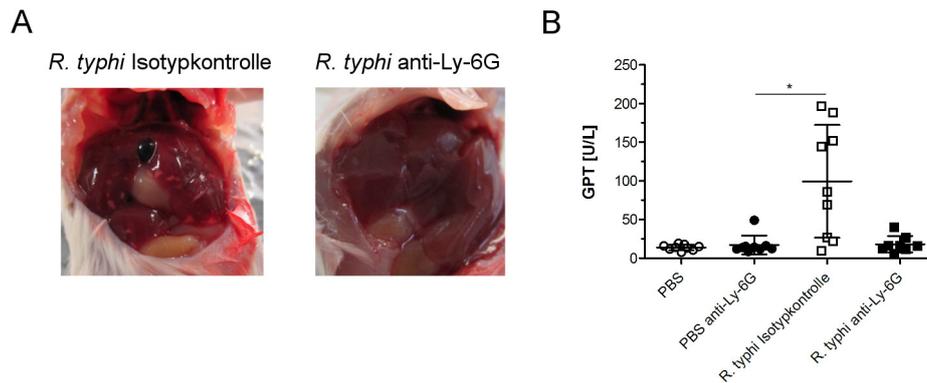


**Abbildung 3.19: Die Depletion der Neutrophilen in CB17 SCID Mäusen nach *R. typhi*-Infektion.** (A) Gezeigt ist der zeitliche Ablauf des Experiments. CB17 SCID Mäuse wurden mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* s.c. in die Schwanzwurzel infiziert. Anschließend erfolgte die Depletion der Neutrophilen alle 3 Tage beginnend mit Tag 6 nach Infektion bis zum Todeszeitpunkt der Mäuse. Neutrophile wurden durch i.p. Injektion eines anti-Ly-6G AK depletiert. Kontrollmäuse wurden entweder infiziert und erhielten einen Ratte IgG2a Isotyp AK, wurden mit PBS-behandelt und erhielten den anti-Ly-6G AK oder wurden ausschließlich mit PBS behandelt. Jeweils 1 Tag nach Behandlung wurde der Erfolg der Depletion durchflusszytometrisch im Blut der Mäuse überprüft. (B) Dargestellt sind die Aufnahmen repräsentativer durchflusszytometrischer Analysen von Blutzellen infizierter anti-Ly6G-behandelter und Isotyp-behandelter CB17 SCID Mäuse an Tag 8 nach s.c. Infektion mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi*. Die Zellen wurden mit einem anti-CD11b- (x-Achse) und anti-Ly-6G-AK (y-Achse) gefärbt.

#### 3.4.1 Neutrophile sind für den Leberschaden in CB17 SCID Mäusen verantwortlich

Um den Einfluss der Neutrophil-Depletion auf den beobachteten Leberschaden in *R. typhi*-infizierten CB17 SCID Mäusen zu analysieren, wurden die Lebern der Mäuse untersucht sowie die GPT-Werte zum Todespunkt bestimmt (Abbildung 3.20). Bereits bei der Sektion der Mäuse war makroskopisch erkennbar, dass sich in Abwesenheit von Neutrophilen im Vergleich zu den Kontrollmäusen keine Nekrosen entwickelt hatten. Zudem war auch die Gallenblase klar. Darüber hinaus wiesen anti-Ly-6G behandelte Mäuse ( $17,1 \pm 4,1$  U/L) gegenüber nicht-infizierten Kontrollmäusen ( $18,1 \pm 13,7$  U/L) keine erhöhten GPT-Werte auf (Abbildung 3.20, B). In infizierten Mäusen, die mit Kontroll-AK behandelt wurden, stiegen die GPT-Werte dagegen signifikant auf  $99,4 \pm 24,3$  U/L ( $p \leq 0,05$ ) an.

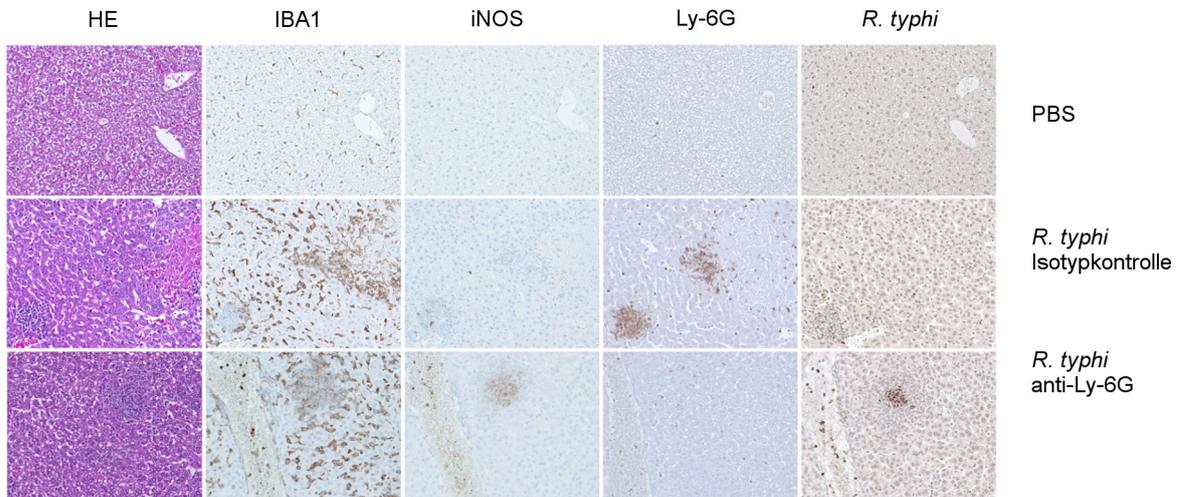
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.20: Die Depletion der Neutrophilen verhindert die Entwicklung eines Leberschadens.** CB17 SCID Mäuse wurden s.c. in die Schwanzwurzel mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* infiziert und anschließend die Population der Neutrophilen mit einem anti-Ly-6G-AK depletiert. (A) Gezeigt ist eine repräsentative Fotografie der Leber einer Isotyp-behandelten (links) sowie einer Neutrophil-depletierten (rechts) Maus. (B) Zum Zeitpunkt des Todes (Tag 14-22) wurden GPT-Werte im Serum von infizierten und anti-Ly-6G-AK-behandelten (schwarze Vierecke), infizierten und Ratte IgG2a-Isotypantikörper-behandelten (weiße Quadrate), sowie PBS- und anti-Ly-6G-AK- (schwarze Kreise) und ausschließlich PBS-behandelten (weiße Kreise) Mäusen ermittelt. Gezeigt sind Daten zweier unabhängiger Experimente ( $n = 8-9$ ). Die statistische Analyse wurde mittels *Kruskal-Wallis-Test* und anschließendem *Dunns Posttest* nach *D'Agostino und Pearson omnibus* Test auf Normalverteilung analysiert (\*  $p \leq 0,05$ ).

Zusätzlich wurde die Leber histologisch zum Zeitpunkt des Todes untersucht und Schnitte mit HE sowie AK gegen IBA1, einem Oberflächenmarker auf Makrophagen, Ly-6G, iNOS als zellulärer Aktivierungsmarker und *R. typhi* gefärbt. Abbildung 3.21 zeigt serielle histologische Schnitte PBS-behandelter (oben) und infizierter Isotyp-behandelter Kontrollmäuse (mitte) sowie infizierter und Neutrophil-depletierter Mäuse (unten). Im Vergleich zu einer PBS-behandelten nicht-infizierten Maus wies das Lebergewebe einer Isotyp-behandelten infizierten Maus in der HE-Färbung eindeutig nekrotische Areale und zelluläre Infiltrate auf. Dabei waren sowohl Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile als auch IBA1<sup>+</sup> Makrophagen nachweisbar. Im Gegensatz dazu waren Nekrosen in der Leber Neutrophil-depletierter Mäuse nicht detektierbar. Allerdings waren auch hier zelluläre Infiltrate nachweisbar. Erwartungsgemäß fanden sich darunter keine Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen, während IBA1<sup>+</sup> Makrophagen ebenfalls homogen im Gewebe sowie in Foci verteilt vorlagen. Die iNOS-Expression war sowohl in Isotyp-behandelten als auch Neutrophil-depletierten Mäusen nachweisbar. *R. typhi* konnte sowohl in der Isotyp-behandelten als auch Neutrophil-depletierten Maus detektiert werden. Die Bakterien lokalisierten dabei hauptsächlich in Foci, die mit Arealen zellulärer Infiltration kolokalisierten.

### 3 Ergebnisse

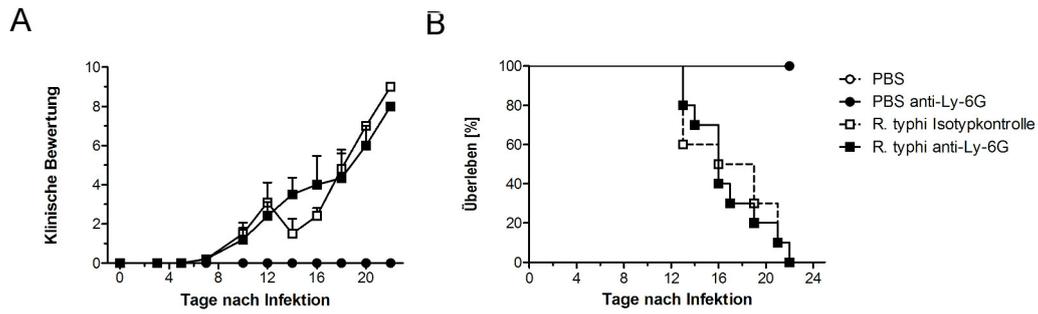


**Abbildung 3.21: Zelluläre Infiltrationen in der Leber *R. typhi*-infizierter Mäuse in der Abwesenheit von Neutrophilen.** Gezeigt sind repräsentative histologische Schnitte der Lebern von CB17 SCID Mäusen am Todestag. CB17 SCID Mäuse wurden s.c. in die Schwanzwurzel mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* infiziert und anschließend die Subpopulation der Neutrophilen alle 3 Tage ab Tag 6 nach Infektion mit einem anti-Ly-6G-AK depletiert (unten). Kontrollmäuse wurden mit PBS behandelt (oben) oder erhielten nach *R. typhi*-Infektion einen Ratte IgG2a Isotyp-AK (Mitte). Die Färbung der seriellen Schnitte erfolgte mit HE sowie mit AK gegen IBA1, iNOS, Ly-6G oder *R. typhi*. Die Gewebeschnitte wurden bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

#### 3.4.2 Die Depletion der Neutrophilen in CB17 SCID Mäusen hat keinen Einfluss auf die Bakterienlast und den tödlichen Verlauf der Infektion

Über einen Zeitraum von 22 Tagen wurden Neutrophil-depletierte CB17 SCID Mäuse beobachtet und der Krankheitsverlauf der Mäuse anhand einer klinischen Bewertung beurteilt (Abbildung 3.22). Beide PBS-behandelten Kontrollgruppen zeigten über die Versuchsdauer zu keinem Zeitpunkt Krankheitssymptome und überlebten die Behandlung. Ein Einfluss des Depletions-AK auf den Krankheitsverlauf in Neutrophil-depletierten Mäusen kann deshalb ausgeschlossen werden. *R. typhi*-infizierte und Isotyp-behandelte Mäuse entwickelten im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine schwere Erkrankung beginnend mit Tag 7 und verstarben innerhalb von 14 bis 22 Tagen. Auch die *R. typhi*-infizierten und Ly-6G-depletierten Mäuse zeigten die ersten Krankheitssymptome innerhalb der ersten Woche nach Infektion. Sie entwickelten ebenfalls eine schwere Erkrankung, die innerhalb von 3 Wochen zum Tod der Mäuse führte. Es zeigte sich dabei kein Unterschied im Krankheitsverlauf oder der Überlebensrate ( $p = 0,07778$ ) zwischen den beiden Mausgruppen. Die Depletion der Neutrophilen verhindert demnach nicht den Tod von *R. typhi*-infizierten CB17 SCID Mäusen.

### 3 Ergebnisse

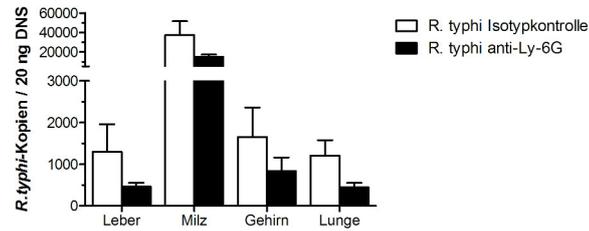


**Abbildung 3.22: Die Depletion der Neutrophilen hat keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und verhindert nicht den Tod von *R. typhi*-infizierten CB17 SCID Mäusen.** CB17 SCID Mäuse wurden s.c. in die Schwanzwurzel mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* infiziert. Die Depletion der Neutrophilen erfolgte durch i.p. Injektion eines anti-Ly-6G AK (Schwarze Vierecke) alle 3 Tage beginnend mit Tag 6 nach Infektion bis zum Todeszeitpunkt der Mäuse. Kontrollmäuse wurden entweder infiziert und erhielten einen Ratte IgG2a Isotyp AK (weiße Quadrate), wurden mit PBS-behandelt und erhielten anti-Ly-6G AK (schwarze Kreise) oder wurden ausschließlich mit PBS behandelt (weiße Kreise). Für die Dauer des Experiments wurde im Rhythmus von 2-3 Tagen der Gesundheitszustand der Mäuse mit Hilfe eines klinischen Bewertungssystems (links) festgehalten und die Überlebensrate (rechts) mittels *Log-rank Test* ( $ns$   $p = 0,07778$ ) analysiert. Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte  $\pm$  SEM von 2 unabhängigen Experimenten ( $n = 9-10$ ). Klinische Bewertung (1-10): gesund (0-4), moderat erkrankt (4-7) oder schwer erkrankt (8-10).

Um ein detaillierteres Bild über den Infektionsverlauf und den Beitrag der Neutrophilen an der Eliminierung der Bakterien zu erhalten, wurde die Bakterienlast in Leber, Milz, Gehirn und Lunge Neutrophil-depletierter Mäuse mittels *R. typhi*-spezifischer realtime-PCR quantifiziert (Abbildung 3.23). Obwohl Neutrophile in vielen Infektionen eine wichtige Funktion bei der Eliminierung eindringender Pathogene einnehmen, wurden in keinem Organ signifikante Unterschiede in der Bakterienlast festgestellt. Überraschenderweise war diese sogar in Neutrophil-depletierten Mäusen gegenüber Mäusen, die mit Kontroll-AK behandelt wurden, in allen untersuchten Organen tendenziell verringert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass Neutrophile bei der Eliminierung von *R. typhi* keine bedeutende Funktion haben.

### 3 Ergebnisse

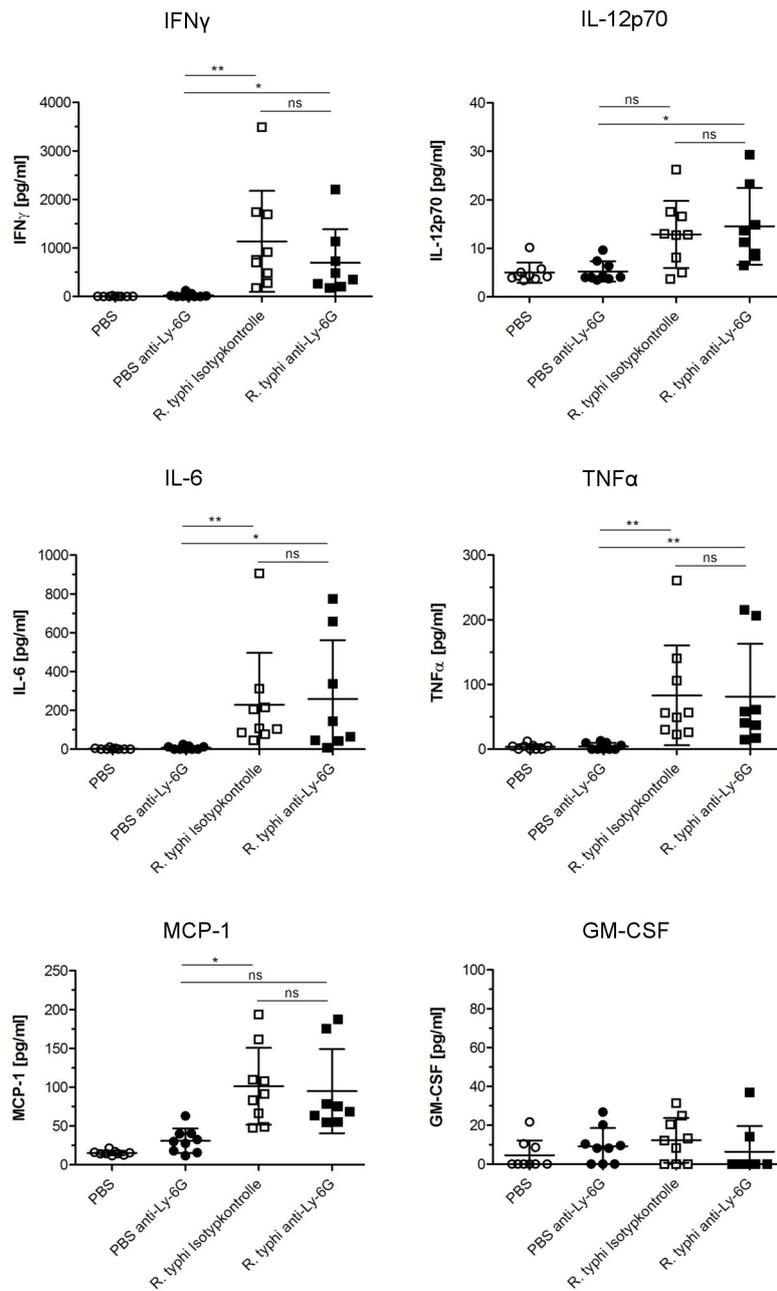


**Abbildung 3.23: *R. typhi*-infizierte CB17 SCID Mäuse zeigten keine veränderte Bakterienlast nach Neutrophil-Depletion.** Die Bestimmung der Bakterienlast in verschiedenen Organen von *R. typhi*-infizierten und Ratte IgG2a Isotyp-behandelten (weiße Balken,  $n = 10$ ) sowie *R. typhi*-infizierten und anti-Ly-6G-behandelten Mäusen (schwarze Balken,  $n = 10$ ) erfolgte mittels *prsA* real-time PCR zum Todeszeitpunkt (Tag 14-22). Daten wurden in Duplikaten von je einer Maus und in 20 ng Gewebe-DNS ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse zwischen den Mausgruppen für die jeweiligen Organe erfolgte mittels *Mann-Whitney-U-Test* nach *D'Agostino und Pearson omnibus* Test auf Normalverteilung (*ns*).

#### 3.4.3 Die Depletion von Neutrophilen hat keinen Einfluss auf die systemische Inflammation in CB17 SCID Mäusen

In der vorliegenden Arbeit, wurde bisher gezeigt, dass infiltrierende Neutrophile für die Entwicklung einer Lebernekrose in CB17 SCID Mäusen ursächlich sind, ihre Abwesenheit jedoch keinen Einfluss auf den tödlichen Infektionsverlauf hat. Es sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss die Neutrophilen bei der Entwicklung der systemischen Inflammation während der *R. typhi*-Infektion haben. Hierfür wurde die Zytokinproduktion im Plasma der Mäuse zum Todeszeitpunkt mittels *LEGENDplex* Assays analysiert (Abbildung 3.24). Keines der untersuchten Zytokine ( $\text{IFN}\gamma$ , IL-12p70, IL-6,  $\text{TNF}\alpha$  als auch MCP-1) war zum Zeitpunkt des Todes in Neutrophil-depletierten Mäusen gegenüber Isotyp-behandelten Mäusen signifikant verändert. Die Depletion der Neutrophilen hat demnach keinen Einfluss auf die hohe systemische Zytokinproduktion.

### 3 Ergebnisse

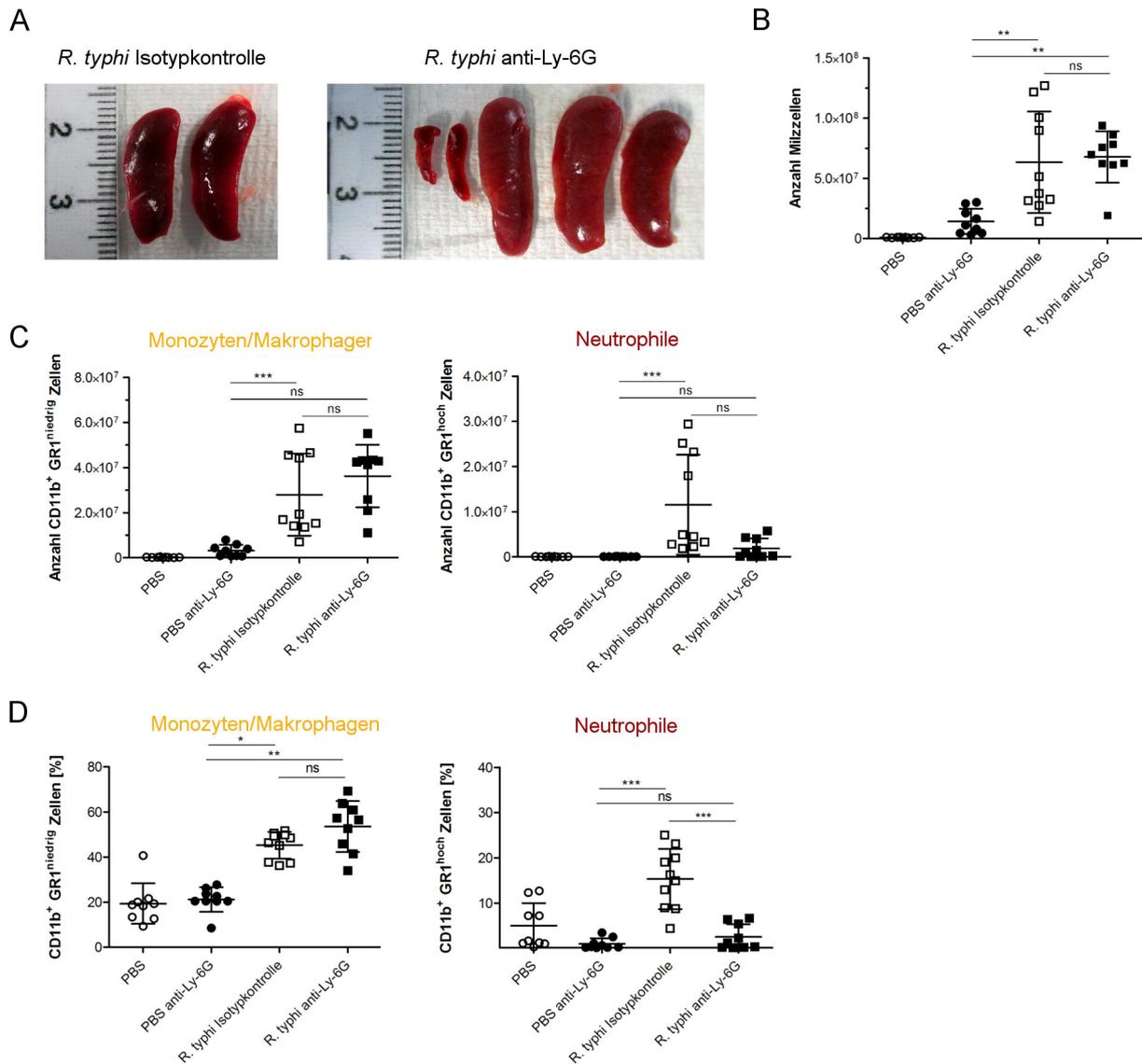


**Abbildung 3.24: Die Depletion der Neutrophilen beeinflusst nicht die systemische Inflammation in CB17 SCID Mäusen.** CB17 SCID Mäuse wurden s.c. in die Schwanzwurzel mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* infiziert und anschließend Neutrophile depletiert. Folgende Mausgruppen wurden für das Experiment verwendet: Infizierte und anti-Ly-6G-AK- (schwarze Vierecke), infizierte und Ratte IgG2a-Isotyp-AK-behandelte Mäuse (weiße Quadrate), sowie PBS- und anti-Ly-6G-AK- (schwarze Kreise) und ausschließlich PBS-behandelte (weiße Kreise) Mäuse. Die systemische Zytokinproduktion wurde mit Hilfe des bead-basierten Immunoassays *LEGENDplex* im Plasma der Mäuse zum Zeitpunkt des Todes (Tag 14-22) bestimmt. Gezeigt sind Daten zweier unabhängiger Experimente (n = 8-9). Die statistischen Analysen wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* und anschließendem *Dunns Posttest* durchgeführt (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).

#### 3.4.4 Die Abwesenheit von Neutrophilen während der *R. typhi*-Infektion wird partiell durch die Expansion von Makrophagen kompensiert

Es sollte schließlich überprüft werden, ob die Abwesenheit der Neutrophilen durch andere Zellen, insbesondere Monozyten/Makrophagen, kompensiert wird. Es wurde deshalb die zelluläre Komposition der Milz nach Depletion der Neutrophilen untersucht. Abbildung 3.25, A zeigt die Milzen von *R. typhi*-infizierten und Isotyp-behandelten bzw. Ly-6G-depletierten Mäusen sowie Kontrollmäusen zum Zeitpunkt des Todes. Sowohl Isotyp-behandelte als auch Neutrophil-depletierte Mäuse entwickelten im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine deutlich sichtbare Splenomegalie. Die Analyse der Milzzellzahl ergab eine signifikante Steigerung der Zellzahl sowohl in Isotyp-behandelten ( $p < 0,05$ ) als auch Neutrophil-depletierten ( $p < 0,05$ ) Mäusen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollmäusen, deren Neutrophile ebenfalls depletiert waren (Abbildung 3.25, B). Die durchflusszytometrische Analyse mit fluoreszenzmarkierten CD11b und GR1 AK zeigte weiter, dass sowohl die Anzahl (Abbildung 3.25, C links) als auch die Frequenz (Abbildung 3.25, D links) der CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen in Isotyp-behandelten gegenüber anti-Ly-6G-behandelten Mäusen tendenziell erhöht war. Sowohl die Anzahl als auch der prozentuale Anteil der Neutrophilen war in den anti-Ly-6G-behandelten gegenüber Isotyp-behandelten Mäusen verringert (Abbildung 3.25, C & D rechts). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit von Neutrophilen partiell durch Monozyten/Makrophagen kompensiert wird.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.25: Monozyten/Makrophagen kompensieren teilweise die Abwesenheit der Neutrophilen.** CB17 SCID Mäuse wurden s.c. in die Schwanzwurzel mit  $1 \times 10^8$  *R. typhi* infiziert und anschließend Neutrophilen mittels anti-Ly-6G-AK depletiert. Folgende Mausgruppen wurden für das Experiment verwendet: Infizierte und anti-Ly-6G-AK- (schwarze Vierecke), infizierte und Ratte IgG2a-Isotyp-AK-behandelte (weiße Quadrate) Mäuse, sowie PBS- und anti-Ly-6G-AK- (schwarze Kreise) und ausschließlich PBS-behandelte (weiße Kreise) Mäuse. Analysen wurden zum Todeszeitpunkt der infizierten Neutrophil-depletierter Mäuse durchgeführt (Tag 14-22). **(A)** Dargestellt sind repräsentative Fotografien der Milzen zweier Isotyp-behandelter (links) sowie zweier PBS-behandelter und dreier Neutrophil-depletierter (rechts) Mäuse. **(B)** Gezeigt ist die Anzahl der Milzzellen. Daten wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt und sind als Einzelwerte mit Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mittels *Kruskal-Wallis-Test* ( $*** p = 0,0008$ ) und anschließendem *Dunns Posttest* ( $** p \leq 0,01$ ) durchgeführt. **(C)** Mittels durchflusszytometrischer Analysen wurden die Anzahl CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen (links) sowie CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophilen (rechts) in der Milz bestimmt. Gezeigt sind Daten von zwei voneinander unabhängigen Experimenten ( $n = 9-10$ ), die als Einzelwerte mit Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt sind. Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe der *One way ANOVA* (links,  $*** p < 0,0001$ ) mit anschließendem *Tukey's* multifaktoriellem Vergleichstest nach *D'Agostino und Pearson omnibus* Test auf Normalverteilung ( $*** p \leq 0,001$ ) sowie des *Kruskal-Wallis-Test* (rechts,  $*** p < 0,0001$ ) und anschließendem *Dunns Posttest* ( $*** p \leq 0,001$ ) **(D)** Mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen wurden die prozentualen Anteile CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>niedrig</sup> Monozyten/Makrophagen (links) sowie CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>hoch</sup> Neutrophilen (rechts) in der Milz ermittelt. Dargestellt sind Daten aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten  $n = 9-10$ , die als Einzelwerte mit Mittelwert  $\pm$  SEM gezeigt sind. Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des *Kruskal-Wallis-Test* (links,  $*** p < 0,0001$ ) und anschließendem *Dunns Posttest* ( $* p \leq 0,05$ ,  $** p \leq 0,01$ ) sowie *One way ANOVA* (rechts,  $*** p < 0,0001$ ) mit anschließendem *Tukey's* multifaktoriellem Vergleichstest nach *D'Agostino und Pearson omnibus* Test auf Normalverteilung ( $*** p \leq 0,001$ ).

### 3 Ergebnisse

Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass Neutrophile für die Entwicklung des Leberschadens in CB17 SCID nach *R. typhi*-Infektion verantwortlich sind. Die Depletion dieser Zellen hatte jedoch weder einen Einfluss auf die Bakterienlast in verschiedenen Organen noch die Entwicklung oder den zeitlichen Verlauf der Erkrankung in Folge der Infektion. Zudem blieb die systemische Inflammation unverändert hoch.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten angeborene Immunmechanismen während einer *R. typhi*-Infektion in der Maus charakterisiert werden. Für diese Untersuchungen wurden B- und T-Zell-defiziente Mäuse des C57BL/6 Stammes (RAG1 KO) und BALB/c Stammes (CB17 SCID) sowie entsprechende Wildtypmäuse mit *R. typhi* infiziert. Beide Wildtypmäuse reagierten vergleichbar und entwickelten keine symptomatische Erkrankung. RAG1 KO und CB17 SCID Mäuse unterschieden sich hingegen stark in ihrer Reaktion auf die Infektion mit *R. typhi*. Im Vergleich zu RAG1 KO Mäusen, die in der initialen Phase wie Wildtypmäuse keine Krankheitssymptome entwickelten und keine detektierbare Bakterienlast aufwiesen, verstarben CB17 SCID Mäuse an den Folgen der Infektion. Diese Mäuse entwickelten eine schwere Erkrankung, darunter einen massiven Leberschaden, der auf die Aktivität der Neutrophilen zurückgeführt werden konnte. Zudem zeigten sie eine hohe Bakterienlast in allen untersuchten Organen. Die Infektion war außerdem von einer starken systemischen Inflammation begleitet. Diese wird wahrscheinlich in erster Linie von Monozyten/Makrophagen verursacht, deren Akkumulation zusammen mit der Zunahme an Neutrophilen ursächlich für die in diesen Mäusen beobachtete Splenomegalie war. Im Folgenden werden die für beide Mausstämme erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

### 4.1 RAG1 KO und CB17 SCID Mäuse als Modell für die Untersuchung der angeborenen Immunantwort gegen *R. typhi*

#### 4.1.1 In Mäusen des C57BL/6 Stammes können angeborene Immunmechanismen eine Infektion mit *R. typhi* über lange Zeit kontrollieren

Um die Rolle der angeborenen Immunantwort zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst B- und T-Zell-defiziente RAG1 KO Mäuse sowie C57BL/6 Kontrollmäuse mit *R. typhi* infiziert. C57BL/6 Mäuse wurden in der Literatur als resistent gegenüber der Infektion mit *R. typhi* [111] sowie *R. conorii* [129, 134], einem Erreger der Zeckenbissfiebergruppe, beschrieben. In Übereinstimmung mit diesen Studien, entwickelten C57BL/6 Mäuse weder eine symptomatische Erkrankung noch eine detektierbare Bakterienlast und überlebten die initiale Phase einer *R. typhi*-Infektion.

Die Infektion von RAG1 KO Mäusen mit *R. typhi* ist in der gegenwärtigen Literatur noch nicht beschrieben. Jedoch wurde eine Resistenz von RAG1 KO Mäusen für die Infektion mit *R. conorii*, einem Erreger der Zeckenbissfieber-Gruppe, gezeigt [129]. RAG1 KO Mäuse überlebten die ersten 20 Tage der Infektion mit diesen Rickettsien. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Versuche zeigen, dass RAG1 KO Mäuse ebenfalls die initiale Phase einer *R. typhi*-Infektion überleben (Abbildung 3.1). Diese B- und T-Zell-defizienten Mäuse entwickelten wie C57BL/6 Wildtyp Mäuse zudem keine symptomatische Erkrankung. Als ein zusätzlicher Parameter für eine potentielle Erkrankung wurden GPT-Werte

## 4 Diskussion

im Serum bestimmt, die auf einen Leberschaden hindeuten. GPT-Werte waren zu keinem Zeitpunkt in der initialen Phase der Infektion erhöht (Abbildung 3.2). Jedoch zeigten einige RAG1 KO wie auch C57BL/6 Wildtypmäuse transient einen mikroskopisch nachweisbaren Leberschaden (Daten nicht gezeigt), ein Krankheitsbild das auch in Menschen bei schweren Verläufen beobachtet wird [106]. Darüber hinaus war keine Bakterienlast in verschiedenen Organen von RAG1 KO Mäusen detektierbar (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass RAG1 KO Mäuse ebenfalls resistent gegenüber einer *R. typhi*-Infektion sind. Aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass RAG1 KO Mäuse 3 bis 4 Monate nach der Infektion mit *R. typhi* neurologische Symptome entwickelten und hieran verstarben [135]. Diese manifestieren sich zunächst als Ataxie und schließlich Lähmungen. RAG1 KO Mäuse entwickeln demnach eine auch bei Menschen auftretende Symptomatik. So werden Fälle von Meningitis und Enzephalitis in Patienten mit endemischem Fleckfieber beschrieben [136–140]. Auch Patienten mit epidemischem Fleckfieber, das durch *R. prowazekii*, dem nächsten Verwandten von *R. typhi* verursacht wird, entwickeln häufig neurologische Symptome, zu denen ebenfalls Ataxie, Parese und Paralyse gehören [64, 141]. Ursächlich für die Entwicklung dieser Symptome ist eine schwere Entzündung des Gehirns, die durch die Gegenwart iNOS-exprimierender infiltrierender Makrophagen sowie die Expansion von IBA1<sup>+</sup> Mikroglia gekennzeichnet ist und wahrscheinlich zur Apoptose von Neuronen führt. Zum Todeszeitpunkt war in diesen Mäusen eine hohe Bakterienlast im Gehirn nachzuweisen, während andere Organe kaum betroffen waren [135]. Diese Ergebnisse zeigen, dass Mäuse des C57BL/6 Stammes eine potente angeborene Immunantwort ausbilden, die für einen langen Zeitraum von 3 bis 4 Monaten einen Schutz gegenüber einer *R. typhi*-Infektion vermitteln kann. Welche angeborenen Immunmechanismen für die langanhaltende Kontrolle in RAG1 KO Mäusen ursächlich sind, ist bisher unklar. Sowohl in C57BL/6 als auch in RAG1 KO Mäusen führte die Infektion mit *R. typhi* zu einem frühen Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen, die bereits an Tag 3 Höchstwerte erreichten und an Tag 7 wieder auf Ausgangsniveau absanken (Abbildung 3.3). Diese hohe Zytokinantwort an Tag 3 geht demnach der Aktivierung des adaptiven Immunsystems deutlich voraus und ist allein auf die angeborene Immunität zurückzuführen. Die Beendigung der Zytokinproduktion und damit der Immunantwort bereits an Tag 7 nach Infektion lässt außerdem den Schluss zu, dass die Bakterien schon zu diesem frühen Zeitpunkt weitgehend eliminiert wurden. IFN $\gamma$  war sowohl in C57BL/6 als auch RAG1 KO Mäusen das dominierende Zytokin an Tag 3 nach Infektion. In RAG1 KO Mäusen waren zudem IL-6 und MCP-1 signifikant erhöht. Hauptsächlich wird IFN $\gamma$  von NK und T-Zellen produziert. IL-12 induziert dabei die Freisetzung von IFN $\gamma$  in NK und T-Zellen [142, 143]. IL-12 war jedoch interessanterweise weder in C57BL/6 noch in RAG1 KO Mäusen signifikant erhöht. Der frühe Zeitpunkt deutet auf dass NK-Zellen als Hauptquelle für die hohen IFN $\gamma$ -Werte hin. Diese Zellen haben eine wichtige Funktion in der frühen Bekämpfung intrazellulärer Erreger. So führte die Depletion von NK-Zellen und des von ihnen produzierten IFN $\gamma$  in *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen zu einer erhöhten Bakterienlast [144]. Auch Infektionsstudien mit Rickettsien haben eine schützende Funktion von NK-Zellen gezeigt. In der Infektion mit *R. conorii* waren NK Zell-depletierte C3H/HeN Mäuse verstärkt suszeptibel und wiesen eine erhöhte Bakterienlast sowie verringerte IFN $\gamma$ - und IL-12-Konzentrationen im Serum auf [111]. Außerdem führte die Depletion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  in *R. conorii*-infizierten CH3/HeN Mäusen zu einer erhöhten Bakterienlast in der Leber sowie im Gehirn und letztlich zum Tod dieser Mäuse [145]. Schließlich wurde auch für *R. australis*, ein weiterer Erreger der

#### 4 Diskussion

Zeckenbissfieber-Gruppe, eine essentielle und protektive Funktion von  $\text{IFN}\gamma$  gezeigt [118]. Die Rolle von NK-Zellen bei der Abwehr von *R. typhi* ist jedoch noch unklar. Vorläufige durchflusszytometrische Analysen zeigten zwar einen tendenziellen Anstieg der NK-Zellen in C57BL/6, in RAG1 KO Mäusen jedoch erst ab Tag 3 (Daten nicht gezeigt). In RAG1 KO Mäusen korrelierte die hohe  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration demnach nicht mit der Zunahme von NK-Zellen. Weitere Studien unserer Arbeitsgruppe haben interessanterweise gezeigt, dass die Depletion von NK-Zellen in *R. typhi*-infizierten RAG1 KO Mäusen die frühe  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion nicht beeinflusste [135]. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für *R. typhi*-infizierte C57BL/6 Mäuse beobachtet [111]. Diese Mäuse wiesen nach NK Zell-Depletion keinen Unterschied in der  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration im Serum im Vergleich zu nicht-depletierten Mäusen auf. Im Gegensatz dazu führte in derselben Studie die NK-Zell-Depletion in *R. conorii*-infizierten C3H/HeN Mäusen zu einer verminderten Freisetzung von  $\text{IFN}\gamma$ . In *R. typhi*-infizierten Mäusen des C57BL/6 Stammes scheinen daher andere Zellen für die frühe  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion verantwortlich zu sein. Jedoch zeigten NK-Zellen sowohl in *R. typhi*-infizierten C57BL/6 als auch *R. conorii*-infizierten C3H/HeN Mäusen eine erhöhte zytotoxische Aktivität [111]. Es wird deshalb angenommen, dass NK-Zellen generell eine wichtige Funktion in der frühen Eliminierung von Rickettsien haben. Jedoch überlebten NK-Zell depletierte RAG1 KO Mäuse die Infektion mit *R. typhi* und zeigten überraschenderweise zu keinem Zeitpunkt eine Bakterienlast [135], wie sie bei der Depletion von NK-Zellen in *R. typhi* infizierten C57BL/6 beobachtet wurde [111]. Die initiale Kontrolle der Infektion mit *R. typhi* in RAG1 KO Mäusen wird demnach durch andere Zellen und Mechanismen vermittelt. Welche Zellen dabei für die frühe Bekämpfung der Bakterien und die Freisetzung der Zytokine, insbesondere  $\text{IFN}\gamma$ , verantwortlich sind ist noch unklar.

C57BL/6 und RAG1 KO Mäuse zeigten im Infektionsverlauf einen frühen Anstieg der Monozyten/Makrophagen sowie der Neutrophilen bis Tag 7 (Abbildung 3.4, B). Wichtige Zytokine für die Generierung und Expansion von Monozyten/Makrophagen sowie Neutrophilen und das Auswandern myeloider Zellen aus dem Knochenmark sind M-CSF und GM-CSF [14–16]. GM-CSF war jedoch im Infektionsverlauf von C57BL/6 und RAG1 KO Mäusen nicht detektierbar (Abbildung 3.3). M-CSF wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Welche Faktoren zu einer Expansion dieser Zellen führen ist deshalb noch unklar. In RAG1 KO Mäusen, nicht aber C57BL/6 Mäusen, waren neben  $\text{IFN}\gamma$  signifikant erhöhte Mengen von IL-6 und MCP-1 ausschließlich an Tag 3 nachweisbar (Abbildung 3.3). Demnach korrelierte die Freisetzung dieser Zytokine mit einem Anstieg von Monozyten/Makrophagen in RAG1 KO Mäusen. IL-6 kann direkt die Granulopoese stimulieren [146] und beeinflusst daher möglicherweise die Expansion und Rekrutierung von Neutrophilen während der Infektion mit *R. typhi*. In der Infektion mit *L. monocytogenes* hatte IL-6 eine entscheidende Funktion [147]. So verstarben IL-6 defiziente Mäuse an der Infektion vermutlich durch eine beeinträchtigte Akquirierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark. Sowohl IL-6 als auch MCP-1 werden hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert [148, 149]. MCP-1 ist außerdem das Hauptchemokin welches die Migration und Rekrutierung von Monozyten, aber auch NK-Zellen, zum Ort einer Infektion und Inflammation reguliert [38–40]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Makrophagen die Hauptproduzenten der in der frühen Phase der Immunantwort gegenüber *R. typhi* freigesetzten Zytokine sind. Interessanterweise waren jedoch weder IL-12 noch  $\text{TNF}\alpha$  in RAG1 KO Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 3.3). Beide Zytokine werden ebenfalls nach Aktivierung von Makrophagen freigesetzt [3, 150–152]. Der beobachtete frühe

Anstieg von Monozyten/Makrophagen sowie Neutrophilen in C57BL/6 und RAG1 KO Mäusen deutet zudem darauf hin, dass diese Zellen eine schützende Funktion in der Infektion mit *R. typhi* ausüben. So wurde bereits für die Infektionen mit *M. tuberculosis* [153], *L. major* [154], *T. gondii* [155] und *L. monocytogenes* [156] eine durch  $\text{IFN}\gamma$  induzierte bakterizide Funktion von Makrophagen gezeigt. Demnach könnten Makrophagen auch bei der Infektion mit *R. typhi* eine wichtige Funktion in der Kontrolle des Erregers einnehmen, wie in Abschnitt 4.1.3 in der Infektion von CB17 SCID Mäusen diskutiert wird.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie weitere Beobachtungen der Arbeitsgruppe [135], dass das angeborene Immunsystem von Mäusen des C57BL/6 Stammes die Ausbreitung des Erregers über lange Zeit verhindern kann. Welche angeborenen Mechanismen hierfür verantwortlich sind ist noch unklar. NK-Zellen haben hierbei jedoch wahrscheinlich eine untergeordnete Funktion. Einen dauerhaften Schutz kann letztlich nur das adaptive Immunsystem vermitteln, da B- und T-Zell-defiziente RAG1 KO Mäuse nach 3 Monaten in Folge der *R. typhi*-Infektion versterben.

### 4.1.2 CB17 SCID Mäuse sind im Gegensatz zu RAG1 KO Mäusen hochsuszeptibel für die Infektion mit *R. typhi*

Als ein weiteres Modell zur Analyse der Rolle der angeborenen Immunität während einer *R. typhi*-Infektion wurden BALB/c sowie B- und T-Zell defiziente CB17 SCID Mäuse desselben Stammes infiziert. BALB/c [124] wurden wie C57BL/6 Mäuse [111] ebenfalls als resistent gegenüber einer *R. typhi*-Infektion beschrieben. Damit übereinstimmend entwickelten *R. typhi*-infizierte BALB/c Kontrollmäuse zu keinem Zeitpunkt während der Infektion eine symptomatische Erkrankung (Abbildung 3.5) oder eine nachweisliche Bakterienlast (Daten nicht gezeigt). Wie in C57BL/6 Mäusen wiesen BALB/c Mäuse ausschließlich an Tag 3 eine signifikant erhöhte  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion auf. Im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen waren zudem auch MCP-1 und IL-6 an Tag 3 nachzuweisen (Abbildung 3.10). Diese Stammspezifischen Unterschiede in der angeborenen Immunantwort auf die Infektion mit *R. typhi* waren in CB17 SCID im Vergleich mit RAG1 KO Mäusen umso deutlicher. So waren CB17 SCID Mäuse suszeptibler für die Infektion als RAG1 KO Mäusen und entwickelten einen schweren Krankheitsverlauf, der innerhalb von 3 Wochen zum Tod der Mäuse führte (Abbildung 3.5). Während im Plasma von RAG1 KO Mäuse ebenfalls die höchsten Zytokinkonzentrationen bereits an Tag 3 nachweisbar waren, zeigten CB17 SCID Mäuse eine stetig ansteigende inflammatorische Immunantwort, mit signifikant erhöhten Mengen insbesondere von  $\text{IFN}\gamma$ , aber auch IL-6, MCP-1, IL-12 und  $\text{TNF}\alpha$  (Abbildung 3.10). Trotz dieser starken Reaktion waren CB17 SCID Mäuse nicht in der Lage, die Infektion zu kontrollieren. Das Immunsystem von CB17 SCID und RAG1 KO Mäusen reagierte demnach unterschiedlich auf die Infektion mit *R. typhi*, so dass diese Mäuse in der Folge ein unterschiedliches Krankheitsbild entwickelten. Auch wenn sich eine hohe Bakterienlast im Gehirn von CB17 SCID Mäusen zum Todeszeitpunkt nachweisen ließ (Abbildung 3.7), zeigten sie im Gegensatz zu RAG1 KO Mäusen keine neurologischen Symptome. Dagegen waren die auffälligsten pathologischen Veränderungen in CB17 SCID Mäusen zum einen eine starke Vergrößerung der Milz (Abbildung 3.8), die auf die Gegenwart der Rickettsien und die fortdauernde Immunantwort hindeutet und häufig auch in Patienten mit endemischem Fleckfieber auftreten [107, 157, 158]. Zum anderen zeigten CB17 SCID Mäuse eine schwere Schädigung der Leber,

## 4 Diskussion

die bereits makroskopisch erkennbar und anhand signifikant erhöhter GPT-Werte messbar war (Abbildung 3.9) und auch in anderen Mausmodellen wie der Infektion mit Zeckenbissfieber-Rickettsien wie *R. conorii* auftritt [129, 159]. Die beobachtete dunkle Färbung der Galle ist zudem ein Hinweis auf Einblutungen. Die mikroskopische Analyse der Leber infizierter CB17 SCID Mäuse zeigte zudem die Infiltration von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen. Weiter konnte gezeigt werden, dass infiltrierende Neutrophile ursächlich für den Leberschaden in diesen Mäusen nach *R. typhi*-Infektion waren, wie in Abschnitt 4.2 eingehender diskutiert wird. Im Gegensatz dazu entwickelten BALB/c Mäuse nur transient einen schwachen Leberschaden (Daten nicht gezeigt), der zwar mikroskopisch nachweisbar war, sich aber nicht in erhöhten GPT-Werten zeigte (Abbildung 3.9, B). Eine Funktionsstörung der Leber ist eine Symptomatik, die ebenfalls im Menschen mit schweren Verläufen von endemischem Fleckfieber assoziiert ist [91, 106, 107, 132]. U.a. zeigte eine retrospektive klinische Studie zwischen 1993 und 2008, dass von 165 untersuchten Patienten 69 % erhöhte GPT- (auch ALT,  $\sim 52$  U/L) und 86 % GOT-Werte (auch AST,  $\sim 82$  U/L) während einer Infektion mit *R. typhi* aufwiesen [106]. Auch die CB17 SCID Maus zeigt damit Krankheitsbilder, wie sie beim Menschen mit endemischem Fleckfieber auftreten kann [106, 107, 157, 158].

Bisher wurden CB17 SCID Mäuse nur in der Infektion mit *R. conorii* untersucht [129]. Abweichend von der Infektion mit *R. typhi* überlebten diese Mäuse die Infektion mit *R. conorii* für mindestens 18 Tage. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Abwehr der Rickettsien der Zeckenbissfieber-Gruppe und der Fleckfieber-Gruppe unterschiedliche Mechanismen erfordert. In CB17 SCID Mäusen war die Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen in der Milz ursächlich für die Entwicklung der Splenomegalie (Abschnitt 3.2.1). Es wurde dabei sowohl eine signifikante Zunahme der Gesamtzellzahl als auch des prozentualen Anteils dieser Zellpopulation festgestellt. Zudem infiltrierten diese Zellen die Leber infizierter Mäuse (Abbildung 3.12). Vorläufige durchflusszytometrische Analysen der Milz zeigten zwar einen starken Anstieg der NK-Zellen bis Tag 3 (Daten nicht gezeigt), dennoch nahmen nur Monozyten/Makrophagen und Neutrophile bis zum Todeszeitpunkt signifikant zu. Diese Zunahme war in RAG1 KO Mäusen nicht zu beobachten (Abbildung 3.4, B). Für die Expansion von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen sind verschiedene Faktoren wie das Zytokin GM-CSF notwendig, welches die Generierung und das Auswandern myeloider Zellen aus dem Knochenmark induziert [14–16]. Wie in RAG1 KO Mäusen beobachtet (Abbildung 3.3), war GM-CSF hingegen zu keinem Zeitpunkt während der Infektion in BALB/c oder CB17 SCID Mäusen erhöht (Abbildung 3.10). Jedoch wiesen BALB/c Mäuse signifikant hohe Mengen von IL-6 vorübergehend an Tag 3 auf. In CB17 SCID Mäusen stieg dieses Zytokin hingegen über den Infektionsverlauf kontinuierlich an (Abbildung 3.10). IL-6 ist ein Zytokin, welches direkt die Granulopoese stimulieren kann [20]. Die Freisetzung des Zytokins korreliert folglich mit der signifikanten Zunahme von Neutrophilen in der Milz und der Leber infizierter CB17 SCID Mäuse sowie mit der tendenziellen Zunahme dieser Zellen in der Milz bis Tag 3 in infizierten BALB/c Mäusen (Abbildung 3.11). IL-6 könnte demnach eine wichtige Rolle für die Generierung und Rekrutierung von Neutrophilen in Mäusen des BALB/c Stammes in der Infektion mit *R. typhi* einnehmen, wie es bereits für die Infektion mit *L. monocytogenes* gezeigt wurde [147]. Das Hauptchemokin welches die Migration und Rekrutierung von Monozyten, aber auch NK-Zellen reguliert, ist MCP-1 [38]. Es wird von verschiedenen Zellen wie Endothelzellen und Fibroblasten als Antwort auf z.B. oxidativen Stress oder bei Infektion produziert [40, 148, 149]. Hauptproduzen-

ten sind jedoch Monozyten und Makrophagen selbst [148, 149]. So produzierten BALB/c Mäuse nach *R. typhi*-Infektion früh signifikant hohe Mengen von MCP-1, ein Anstieg der Monozyten/Makrophagen konnte jedoch nicht detektiert werden (Abbildung 3.11, B). Im Gegensatz dazu korrelierte in CB17 SCID Mäusen der signifikante Anstieg der Monozyten/Makrophagen in der Milz und Leber mit der stetigen Zunahme an MCP-1 im Infektionsverlauf. Neben der systemischen Produktion von IL-6 und MCP-1 wiesen CB17 SCID Mäuse im Plasma einen Anstieg weiterer inflammatorischer Zytokine auf, darunter in hohem Maße  $\text{IFN}\gamma$  und in geringeren Mengen  $\text{TNF}\alpha$  und IL-12 (Abbildung 3.10). Ähnlich wie in RAG1 KO Mäusen an Tag 3 war auch in CB17 SCID Mäusen  $\text{IFN}\gamma$  das dominierende Zytokin, das über den gesamten Infektionsverlauf zunehmend freigesetzt wurde. In CB17 SCID Mäusen zeigte sich zudem, abweichend von RAG1 KO Mäusen, tendenziell ein früher starker Anstieg der NK-Zellen, welche die frühen hohen  $\text{IFN}\gamma$ -Werte erklären könnten (Daten nicht gezeigt). Die von aktivierten Makrophagen freigesetzten Zytokine IL-12 und  $\text{TNF}\alpha$  [3, 150–152] stiegen vergleichend in einem sehr viel geringeren Maße als  $\text{IFN}\gamma$ , aber dennoch signifikant an. IL-12 ist zwar das wichtigste  $\text{IFN}\gamma$ -induzierende Zytokin in NK- und T-Zellen [142, 143], es war jedoch zu diesem frühen Zeitpunkt nicht erhöht. Zudem korrelierte der späte signifikante Anstieg von  $\text{IFN}\gamma$  in infizierten CB17 SCID Mäusen nicht mit der Zunahme der NK-Zellen. Die späten signifikant hohen  $\text{IFN}\gamma$ -Werte lassen sich daher vermutlich nicht alleine auf NK-Zellen zurückführen.

Diese Beobachtungen zeigen zusammenfassend, dass das angeborene Immunsystem in Mäusen des BALB/c Stammes im Vergleich mit Mäusen des C57BL/6 Stammes weniger effizient in der Bekämpfung von *R. typhi* ist. Das Immunsystem von RAG1 KO Mäusen kann die Ausbreitung der Bakterien in der Peripherie über lange Zeit kontrollieren, letztlich die Verbreitung im Gehirn, einem immunprivilegierten Organ, aber nicht verhindern. In CB17 SCID Mäusen kommt es hingegen zu einer frühen Dissemination des Erregers in alle Organe, einer Lebernekrose und Splenomegalie in Folge einer andauernden Immunantwort. Zudem zeigen sie eine starke systemische Inflammation, die wahrscheinlich ursächlich für den tödlichen Infektionsverlauf ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Qualität des angeborenen Immunsystems den Verlauf der Infektion mit *R. typhi* und somit auch den Verlauf der Erkrankung bestimmt.

### 4.1.3 Die unterschiedliche Suszeptibilität von Mäusen des BALB/c und C57BL/6 Stammes gegenüber *R. typhi* und die Rolle der Makrophagen

Die Infektion von CB17 SCID und RAG1 KO Mäusen mit *R. typhi* führt zu einem unterschiedlichen Krankheitsverlauf in beiden Mausgruppen. Während RAG1 KO Mäuse die Infektion für mehrere Monate überleben [135] sterben CB17 SCID Mäuse bereits innerhalb der ersten 3 Wochen nach Infektion. Welche Faktoren ursächlich sind für diesen Unterschied ist bisher unklar. Es ist zu vermuten, dass diese sowohl auf zellulärer Ebene als auch im humoralen Bereich zu finden sind. Sowohl CB17 SCID [127, 128] als auch RAG1 KO Mäuse [126] sind defizient in der Entwicklung reifer B- und T-Zellen, wurden allerdings auf einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund gezüchtet. Während CB17 SCID auf BALB/c Mäuse zurückzuführen sind [127, 128], wurden RAG1 KO Mäuse auf dem Hintergrund von C57BL/6 Mäusen gezüchtet [126]. Unterschiede im Infektionsverlauf zwischen BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden bereits in verschiedenen Studien mit intrazellulären Pathogenen wie *L. monocytogenes*

#### 4 Diskussion

[160, 161], *T. cruzi* [162] und Leishmanien [163, 164] beobachtet. So sind BALB/c im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen grundsätzlich suszeptibler gegenüber Infektionen mit diesen intrazellulären Erregern. Z.B. entwickelten BALB/c Mäuse im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen nach Infektion mit *L. monocytogenes* eine starke Lebernekrose [165]. Diese Unterschiede werden im Allgemeinen hauptsächlich auf die unterschiedliche Polarisierung der T-Zell-Antwort zurückgeführt. So produzieren resistente C57BL/6 Mäuse in der *L. major*-Infektion  $\text{IFN}\gamma$ , das Makrophagen aktiviert Pathogene zu eliminieren, während T-Zellen suszeptibler BALB/c Mäuse eher IL-4 produzieren, das Makrophagen suprimiert [163, 166]. Die in C57BL/6 dominierende  $\text{CD4}^+$  Th1- und zytotoxische  $\text{CD8}^+$  T-Zellantwort ist somit effizienter in der Abwehr intrazellulärer Erreger. Wie in früheren Studien beschrieben waren beide Mausstämme jedoch resistent gegenüber der Infektion mit *R. typhi* und entwickelten keine symptomatische Erkrankung [111, 124]. Ähnlich überlebten BALB/c Mäuse auch die Infektion mit *R. prowazekii* [120]. Unterschiede in der angeborenen Immunantwort zwischen den beiden Mausstämmen sind in der gegenwärtigen Literatur dagegen kaum beschrieben. Interessanterweise verstarben C57BL/6 Mäuse nach der i.v. Infektion mit *R. prowazekii*, dem nächsten Verwandten von *R. typhi*, innerhalb weniger Stunden an einem septischen Schock, während BALB/c Mäuse überlebten [120]. Dies ist ein Hinweis auf einen durch das angeborene Immunsystem ausgelösten septischen Schock, der in BALB/c Mäusen mit derselben infektiösen Dosis nicht auftrat. Tatsächlich fanden sich in der Infektion mit *R. typhi* große Unterschiede in der angeborenen Immunantwort zwischen CB17 SCID und RAG1 KO Mäusen. Im Plasma *R. typhi*-infizierter RAG1 KO Mäuse waren an Tag 3 nach Infektion sowohl  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-12 als auch IL-6 nachweisbar (Abbildung 3.3). Mit Ausnahme von  $\text{IFN}\gamma$ , das in ähnlicher hoher Konzentration vorlag, war jedoch keines der genannten Zytokine im Plasma von CB17 SCID Mäusen zu diesem Zeitpunkt der Infektion detektierbar (Abbildung 3.10). Signifikant erhöhte Mengen von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-12 und IL-6 waren erst nach Tag 8 in CB17 SCID Mäusen messbar.

Die Eliminierung von Bakterien während der frühen angeborenen Immunantwort wird vorrangig von Phagozyten wie Makrophagen und Neutrophilen sowie von NK-Zellen vermittelt. Die Ergebnisse der NK-Zell-Depletion in RAG1 KO Mäusen [135] deuten darauf hin, dass diese Zellen nur eine untergeordnete Funktion in der Eliminierung von *R. typhi* haben. Die Zunahme der Neutrophilen unterschied sich nicht wesentlich zwischen den beiden Wildtypstämmen nach *R. typhi*-Infektion. Zudem zeigte sich kein Unterschied in der Zahl Neutrophilen in der Milz von nicht-infizierten RAG1 KO und CB17 SCID Mäusen. Erst im Verlauf der fortschreitenden Infektion nahm die Zahl der Neutrophilen in CB17 SCID Mäusen signifikant zu. Ihre Depletion führte in diesen Mäusen jedoch weder zu einer gesteigerten Bakterienlast noch einer verringerten Überlebensrate (Abschnitt 3.4.2). Auch Neutrophile scheinen daher für die Eliminierung von *R. typhi* nicht essentiell zu sein. Allerdings wurden Unterschiede insbesondere von Monozyten/Makrophagen zwischen CB17 SCID (Abbildung 3.11, B) und RAG1 KO Mäusen (Abbildung 3.4, B) im Infektionsverlauf festgestellt. Zwar waren vor Infektion mit *R. typhi* tendenziell mehr Monozyten/Makrophagen in der Milz von Wildtyp BALB/c Mäusen zu finden, diese nahmen aber nach Infektion nicht zu (Abbildung 3.11, B). Im Gegensatz dazu war ein Anstieg dieser Zellen in C57BL/6 Mäusen bis Tag 7 nachweisbar (Abbildung 3.4, B). Zu diesem Zeitpunkt hatte sich ihre Zahl in der Milz verdoppelt. Bereits in früheren Studien wurden Unterschiede in der Generierung von Monozyten/Makrophagen zwischen BALB/c und C57BL/6 Mäusen beschrieben. In der Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *L. monocytogenes* bspw. waren bereits an Tag 1 mehr Monozyten nachweisbar,

#### 4 Diskussion

während in BALB/c Mäusen eher Neutrophile zu finden waren [165]. Ein noch gravierenderer Unterschied war zwischen CB17 SCID und RAG1 KO Mäusen in der *R. typhi*-Infektion zu beobachten. So wiesen RAG1 KO Mäuse (Abbildung 3.4, B) im nicht-infizierten Zustand vergleichend über 2,9-mal so viele Monozyten/Makrophagen in der Milz wie CB17 SCID Mäuse auf (Abbildung 3.11, B). Trotz akkumulierender Monozyten/Makrophagen in CB17 SCID Mäusen blieb die Überzahl dieser Zellen in RAG1 KO Mäusen sogar bis Tag 7 nach Infektion bestehen. Eine Stamm-spezifische effizientere Eliminierung durch Makrophagen sowie eine anfänglich höhere Basalzahl dieser Zellen in der Milz könnte einen entscheidenden Einfluss auf den Infektionsverlauf nach Infektion mit *R. typhi* haben.

Interessanterweise waren sowohl in RAG1 KO (Abbildung 3.3) als auch in CB17 SCID Mäusen (Abbildung 3.10) neben  $\text{IFN}\gamma$  in erster Linie IL-6 und MCP-1 nachweisbar, Zytokine die vorwiegend von Makrophagen produziert werden. Diese Zytokine waren in RAG1 KO gegenüber CB17 SCID Mäusen an Tag 3 nach Infektion um das 3-fache erhöht und korrelierten folglich mit der zunehmenden Anzahl von Monozyten/Makrophagen. In CB17 SCID Mäusen stiegen die Konzentrationen von IL-6 und MCP-1 stetig im Infektionsverlauf mit zunehmender Zahl von Monozyten/Makrophagen an. Darüber hinaus ist auch eine gesteigerte Funktionalität dieser Zellen in C57BL/6 im Vergleich zu BALB/c Mäusen denkbar. So wurde gezeigt, dass auf Stimulation mit TLR-Liganden C57BL/6 gegenüber BALB/c Makrophagen höhere Mengen  $\text{TNF}\alpha$  und IL-12 sowie bakterizides NO produzieren [167]. Darüber hinaus zeigten BALB/c gegenüber C57BL/6 Mäusen in einem Sepsismodell durch Blinddarpunktur eine schlechtere Eliminierung der in den Peritonealraum eindringenden Bakterien [167]. Ein Hinweis auf die Bedeutung von Makrophagen auch bei der Abwehr von Rickettsien zeigte sich mit der Beobachtung, dass *R. akari* von Makrophagen aus resistenten Mausstämmen *in vitro* schneller und effizienter eliminiert wird im Vergleich zu Makrophagen aus suszeptiblen Mausstämmen [168]. Zudem wurde für die Infektionen mit *O. tsutsugamushi* in suszeptiblen C3H/HeN Mäusen eine verspätete Aktivierung von Makrophagen im Vergleich zu resistenten BALB/c Mäusen beobachtet [112]. Interessanterweise unterschieden sich die Konzentrationen von  $\text{IFN}\gamma$  in CB17 SCID und RAG1 KO Mäusen an Tag 3 nicht. Die Depletion von NK-Zellen in *R. typhi*-infizierten RAG1 KO Mäusen hatte zudem gezeigt, dass diese nicht für die  $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung verantwortlich sind [135]. Ob dieses Zytokin in der *R. typhi*-Infektion von Makrophagen produziert wird ist noch unklar. Allerdings werden neben NK- und T- Zellen auch Makrophagen als mögliche  $\text{IFN}\gamma$ -Produzenten beschrieben [169, 170]. So wird zum Beispiel  $\text{IFN}\gamma$  von Makrophagen als Antwort auf eine *M. tuberculosis*-Infektion, wenn auch in geringen Mengen, freigesetzt [151, 171, 172]. Da Makrophagen ebenfalls Zielzellen für Rickettsien darstellen [63], ist ein direkter Einfluss der Bakterien auf die Zytokinfreisetzung denkbar und könnte die hohe  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion auch in Abwesenheit von IL-12 erklären. Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben jedoch gezeigt, dass Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6 Mäusen auf die *R. typhi*-Infektion *in vitro* nicht mit der Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  reagierten (Daten nicht gezeigt). Weitere Faktoren, die eine  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in Makrophagen induzieren können, sind IL-12 zusammen mit IL-18 [173, 174]. Zudem wurde beobachtet, dass IL-12 und intrazelluläre Bakterien wie Mycobakterien synergetisch die Freisetzung von  $\text{IFN}\gamma$  in infizierten Makrophagen *in vitro* induzieren [151]. Darüber hinaus induziert  $\text{IFN}\gamma$  seine eigene Expression in Makrophagen auf autokrine Weise [175]. Auch wenn *R. typhi in vitro* die Expression von Zytokinen in Makrophagen nicht selbst induziert, könnten andere Faktoren im infizierten Gewebe möglicherweise zu einer Aktivierung dieser Zellen beitragen.

#### 4 Diskussion

In CB17 SCID Mäusen konnte *R. typhi* nach Infektion in Monozyten/Makrophagen nachgewiesen werden (Abbildung 3.13). Diese Zellen zeigten außerdem einen antibakteriellen Aktivierungsstatus, der durch die Expression von iNOS (Abbildung 3.15) und die Produktion von ROS (Abbildung 3.14) charakterisiert war. Dennoch korrelierte die Aktivierung der Zellen nicht mit der Phagozytose von *R. typhi*, sondern trat hauptsächlich unabhängig von dieser auf (Abbildung 3.16, A). Makrophagen werden klassischerweise über das Erkennen von PAMPs auf Mikroben über zum Beispiel TLR aktiviert. LPS als Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien ist ein PAMP, das von Makrophagen über TLR4 erkannt wird. Dieser Stimulus induziert die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  sowie die Expression von iNOS und die Freisetzung von NO in Makrophagen [176–178]. Diese Mechanismen sind essentiell für das effiziente Eliminieren von intrazellulären Bakterien wie bspw. *M. tuberculosis* [179–181]. Neben der Freisetzung von NO ist die Produktion von ROS durch Phagozyten ein wichtiger antibakterieller Mechanismus in der Eliminierung intrazellulärer Bakterien [182]. Als ein Gram-negatives Bakterium verfügt auch *R. typhi* über PAMPs wie LPS als Zellwandbestandteil [70, 71], was eine Aktivierung von Makrophagen während einer Infektion über beispielsweise TLR4 vermuten lässt. Dennoch reagierten weder BALB/c (Abbildung 3.18, B und C) noch C57BL/6 Knochenmarksmakrophagen (Daten nicht gezeigt) *in vitro* auf *R. typhi* mit der Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-12 oder der Expression von iNOS und Freisetzung von NO. Klassisch aktivierte Makrophagen zeigen neben der Freisetzung inflammatorischer Zytokine außerdem eine Hochregulation von MHCI und II sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 [183]. Diese werden benötigt für die Funktion der Makrophagen als APZ und folgende Induktion adaptiver Immunmechanismen. Auch eine Hochregulation von MHCI und CD80 konnte nach Infektion von Makrophagen mit *R. typhi in vitro* nicht festgestellt werden (Abbildung 3.18, A) .

Diese Ergebnisse zeigen, dass *R. typhi* Makrophagen nicht klassisch über TLR4 aktiviert und vermutlich unerkant in die Zelle eindringt. Dies hat möglicherweise ebenfalls Auswirkungen auf die adaptive Immunantwort, deren effiziente Induktion auf einer Aktivierung durch APZ wie Makrophagen beruht. Ohne Aktivierung durch Zytokine können Makrophagen Rickettsien wie *R. akari* [168, 184] und *O. tsutsugamushi* [112, 113] nicht eliminieren, und die Erreger replizieren in diesen Zellen. *R. typhi* infiziert sowohl murine als auch humane Makrophagen *in vitro* und überlebt zudem in diesen Zellen [185, 186]. Wie für *R. conorii* gezeigt [110], entkommen Rickettsien dabei bereits innerhalb weniger Minuten aus dem Phagosom der Makrophagen und replizieren anschließend frei im Zytosol. Auch für *R. prowazekii*, dem nächsten Verwandten von *R. typhi*, sowie *R. rickettsii* wurde gezeigt, dass diese im Zytosol der Wirtszelle residieren und aus dem Phagosom entkommen [99]. Tatsächlich zeigten Monozyten/Makrophagen in CB17 SCID Mäusen einen aktivierten Phänotyp (Abbildung 3.14, B; Abbildung 3.15). Die Aktivierung der Zellen war jedoch unabhängig von der Aufnahme der Bakterien (Abbildung 3.16, A). Da Makrophagen auch *in vitro* nicht von *R. typhi* aktiviert wurden (Abbildung 3.18), ist die Aktivierung der Makrophagen *in vitro* vermutlich auf indirekte Mechanismen zurückzuführen und nicht auf die Bakterien selbst. Dies ist auch in RAG1 KO Mäusen zu vermuten. Eine solche Aktivierung von Makrophagen könnte zum Beispiel durch *Damage-associated molecular pattern molecules* (DAMPs) induziert werden. Diese können inflammatorische Antworten wie die Freisetzung von IL-12 und anderen Zytokinen in Makrophagen induzieren [187–190]. Zusammen deuten diese Beobachtungen jedoch

darauf hin, dass eine solche indirekte und unspezifische Aktivierung nicht ausreicht, um die antibakterielle Funktion von Makrophagen gegenüber *R. typhi* effizient zu induzieren. Selbst große Mengen von  $\text{IFN}\gamma$ , die in CB17 SCID Mäusen freigesetzt werden (Abbildung 3.10), scheinen nicht ausreichend zur Aktivierung der Makrophagen beizutragen. Zusätzlich hat die unkontrollierte Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 negative Auswirkungen. So wirkt  $\text{TNF}\alpha$  in großen Mengen zytotoxisch und ist zusammen mit IL-6 ebenso wie NO und ROS, mit pathologischen Schäden sowie septischem Schock und Kraftverlust assoziiert [191–193]. Diese Faktoren sind vermutlich ursächlich für den Tod von CB17 SCID Mäusen in Folge einer *R. typhi*-Infektion.

Ob Makrophagen *R. typhi* in RAG1 KO Mäusen *in vivo* effizient eliminieren können und für die langlebige Kontrolle der *R. typhi*-Infektion sowie die frühe Zytokinfreisetzung, besonders von  $\text{IFN}\gamma$ , verantwortlich sind, ist noch unklar.

## 4.2 Der Leberschaden in *R. typhi*-infizierten CB17 SCID Mäusen ist ein immunpathologischer Effekt infiltrierender Neutrophiler

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der in CB17 SCID Mäusen beobachtete Leberschaden von der Infiltration von Monozyten/ Makrophagen sowie Neutrophilen begleitet war (Abbildung 3.12). Neben Endothelzellen und Makrophagen, sind möglicherweise auch Hepatozyten Zielzellen für *R. typhi*. So infiziert *R. conorii* humane Hepatozyten direkt und induziert in diesen Zellen die Expression von iNOS [130]. Zudem verursacht *R. conorii* in suszeptiblen Mäusen wie C3H/HeN [159] sowie CB17 SCID [129] ebenfalls einen transienten Leberschaden und infiziert neben Hepatozyten auch Kupferzellen. Ob *R. typhi* ebenfalls Hepatozyten infiziert ist nicht bekannt. Die Leber von CB17 SCID Mäusen wies jedoch eine eindeutige Bakterienlast auf (Abbildung 3.7). Die Leber nimmt eine wichtige Funktion in der angeborenen Immunantwort gegen Mikroben und Toxine ein, die die intestinale Barriere passieren oder sich systemisch verbreiten [42]. Kupferzellen, die residierenden Makrophagen der Leber, sind wichtig für die schnelle Eliminierung von Pathogenen [194]. Vorrangegangene Studien zeigen jedoch, dass Neutrophile und weniger Kupferzellen für die Eliminierung von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien in der Leber verantwortlich sind [195–198]. Neutrophile sind kurzlebige Zellen, welche im Blut zirkulieren und sind die ersten Leukozyten, die zum Ort einer Infektion oder eines Gewebeschadens rekrutiert werden [199]. Für die Eliminierung von Bakterien besitzen diese Zellen eine Reihe von bakteriziden Effektorfunktionen, zu denen die Sekretion von MPO, NO und ROS gehören [4, 200]. So konnte für *M. tuberculosis* gezeigt werden, dass iNOS-defiziente Mäuse suszeptibler gegenüber einer Infektion waren und eine vermehrte bakterielle Replikation aufwiesen [201]. In der Infektion mit *L. monocytogenes* wiesen Neutrophil-depletierte Mäuse zudem eine erhöhte Bakterienlast in der Leber und in der Milz auf [202, 203]. Darüber hinaus verstarben diese früher an den Folgen der Infektion. Diese Beobachtungen zeigen, dass Neutrophile essentiell für die bakterielle Eliminierung in der Leber sind. Sowohl Neutrophile in der Milz als auch in die Leber infiltrierende Neutrophile phagozytierten *R. typhi* nachweislich (Abbildung 3.13, C). Die Depletion von Neutrophilen in CB17 SCID Mäusen hatte jedoch überraschenderweise keinen Einfluss auf die Bakterienlast in den untersuchten Organen (Abbildung 3.23). Daher ist anzunehmen, dass Neutrophile in der CB17 SCID Maus keine

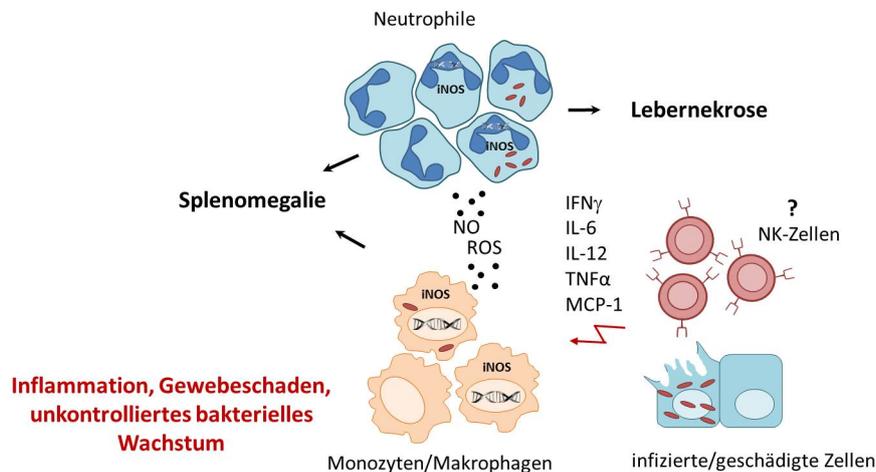
#### 4 Diskussion

bedeutende Funktion bei der Eliminierung von *R. typhi* einnehmen. Sowohl Neutrophile in der Milz als auch in der Leber zeigten jedoch einen aktivierten Phänotyp (Abbildung 3.15, C). Ähnlich wie bei Makrophagen werden Neutrophile Effektorfunktionen normalerweise über Erkennung von Pathogenen oder Zytokinen, die während der Infektion freigesetzt werden, induziert [4, 29]. Die Aktivierung der Neutrophilen in der *R. typhi*-Infektion korrelierte jedoch, wie bereits bei Makrophagen beobachtet, nicht mit der Phagozytose der Bakterien (Abbildung 3.16, B). Demnach könnte auch die Aktivierung von Neutrophilen möglicherweise auf indirekten Mechanismen während der Infektion beruhen. Potentielle Faktoren, die zu einer Aktivierung von Neutrophilen führen, sind auch hier DAMPs wie z.B. Hitzeschockproteine (HSP) [13, 204], die in geschädigten Geweben freigesetzt werden. Diese können Neutrophile einerseits direkt aktivieren oder aber lokale Kupfferzellen stimulieren, ROS, IL-1, TNF $\alpha$  und IL-6 sowie Chemokine freizusetzen [20]. Dies induziert wiederum die weitere Rekrutierung und Aktivierung von u.a. Neutrophilen zum Ort des Gewebeschadens. Neben der Funktion als Phagozyten kann eine überschießende Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen zu einer Leberschädigung führen [4, 17, 28–30]. Hiermit werden vornehmlich die Freisetzung von ROS und NO sowie sekretierte Proteasen in Verbindung gebracht. Die Rolle der Neutrophilen bei der Schädigung der Leber in der Infektion mit Rickettsien wurde bislang nicht untersucht. In dieser Arbeit wurden Neutrophile erstmals als ursächlich für den Leberschaden in der Maus identifiziert (Abschnitt 3.4.1). Die Depletion dieser Zellen schützte die CB17 SCID Mäuse vollständig vor einer Schädigung der Leber. Sowohl makroskopisch als auch histologisch waren keine Nekrosen mehr nachweisbar, und ein Anstieg der GPT-Werte wurde nicht mehr beobachtet. Dennoch waren zelluläre Infiltrate in der Leber erkennbar. Hierbei handelte es sich um Monozyten/Makrophagen (Abbildung 3.21; Abbildung 3.25, C & D). Offensichtlich tragen diese jedoch nicht zur Schädigung der Leber bei. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Leberschaden nach *R. typhi*-Infektion in CB17 SCID Mäusen eine Ursache der Neutrophil-Aktivität ist und weniger auf einer direkten Zerstörung von Hepatozyten durch *R. typhi* beruht. Auch der Leberschaden *R. conorii*-infizierter CB17 SCID [129] und C3H/HeN Mäuse [159] ist mit infiltrierenden Immunzellen assoziiert. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Infiltration dieser Zellen und der beobachteten Lebernekrose wurde in diesen Studien jedoch nicht untersucht. Allerdings ist aus anderen Tiermodellen ein schädigender Einfluss von aktivierten Neutrophilen auf die Leber bekannt. So konnte nicht nur die Depletion von Neutrophilen in Tiermodellen mit Sepsis Leberschäden verhindern, sondern auch die Gabe von Antioxidantien [205–207]. Obwohl eine Schädigung der Leber in Abwesenheit von Neutrophilen nicht mehr beobachtet wurde, verstarben Neutrophil-depletierte CB17 SCID Mäuse in vergleichbarem Zeitraum wie Kontrollmäuse an den Folgen der *R. typhi*-Infektion (Abbildung 3.22). Wahrscheinliche Ursache hierfür ist die überschießende systemische inflammatorische Reaktion. Alle gemessenen inflammatorischen Zytokine (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-6) waren nach Depletion der Neutrophilen unverändert hoch (Abbildung 3.24). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Neutrophile nicht nur eine untergeordnete Funktion in der Eliminierung von *R. typhi* besitzen, sondern auch keinen Einfluss auf die systemische Inflammation haben. Hierfür sind wahrscheinlich vornehmlich Monozyten/Makrophagen verantwortlich. Die Zahl dieser Zellen war in der Milz von Neutrophil-depletierten CB17 SCID Mäusen nur unwesentlich erhöht (Abbildung 3.25, C). Diese Beobachtung stimmt mit der Infektion von CB17 SCID Mäusen mit *L. monocytogenes* nach Depletion von Neutrophilen überein [203]. Auch hier wurden keinen wesentlichen Unterschiede in der Zellzahl der Monozytenpopulation in

## 4 Diskussion

der Milz beobachtet.

Abschließend stellt Abbildung 4.1 die in CB17 SCID Mäusen beobachteten Reaktionen auf die Infektion mit *R. typhi* sowie die hypothetischen Funktionen von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen zusammenfassend dar.



**Abbildung 4.1: Hypothetische Funktion von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen in der Infektion von CB17 SCID Mäusen mit *R. typhi*.** CB17 SCID Mäuse des BALB/c Stammes sind suszeptibel für die Infektion mit *R. typhi*. Diese Mäuse entwickeln bereits eine Woche nach Infektion eine schwere symptomatische Erkrankung, und *R. typhi* disseminiert dabei in alle Organe. Im Verlauf der Infektion kommt es zu einer Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen in der Milz, die ursächlich für die Entwicklung einer Splenomegalie in diesen Mäusen ist. Darüber hinaus zeigen CB17 SCID Mäuse eine schwere Schädigung der Leber, die allein durch die immunpathologische Aktivität der Neutrophilen verursacht wird. In der *R. typhi*-Infektion exprimieren Neutrophile iNOS und setzen NO und zudem auch ROS frei, die sich schädigend auf die Leber auswirken können. Obwohl Neutrophile *R. typhi* phagozytieren und diesen antibakteriellen Phänotyp aufweisen, haben sie bei der Eliminierung der Bakterien keine wesentliche Funktion. Über den Infektionsverlauf entwickeln CB17 SCID Mäuse eine starke Inflammation mit hohen Konzentrationen von IFN $\gamma$ , aber auch IL-6, MCP-1, TNF $\alpha$  und IL-12. Der Anstieg dieser Zytokine korreliert mit der Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen in der Milz und Leber. Dabei sind Monozyten/Makrophagen wahrscheinlich die Hauptproduzenten dieser Zytokine. Auch Monozyten/Makrophagen weisen in der Infektion einen aktivierten Phänotyp auf, der durch die Expression von iNOS gekennzeichnet ist. Monozyten/Makrophagen erkennen *R. typhi* jedoch nicht direkt und werden nicht auf klassische Weise aktiviert. Vielmehr scheinen Makrophagen *in vivo* indirekt über endogene Gefahrensignale infizierter und/oder geschädigter Zellen bzw. Zytokine aktiviert zu werden. Diese Art der Aktivierung reicht für die Eliminierung der Bakterien jedoch nicht aus, so dass es in der Folge zu einer Ausbreitung des Erregers im gesamten Organismus kommt. Schließlich versterben CB17 SCID Mäuse vermutlich an den Folgen einer Sepsis. Die Funktion der NK-Zellen in diesem Mausmodell ist noch unbekannt.

### 4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Infektion mit *R. typhi* Stamm-spezifische Unterschiede in der Reaktion auf den Erreger, im Infektionsverlauf sowie dem Krankheitsbild in RAG1 KO (C57BL/6) und CB17 SCID (BALB/c) Mäusen festgestellt. RAG1 KO Mäuse überlebten die Infektion mit *R. typhi* für mehrere Monate, bevor sich die Bakterien im Gehirn ausbreiteten und die Mäuse an den Folgen einer Gehirnentzündung verstarben. Sie besitzen demnach ein potentes angeborenes Immunsystem, dass die Ausbreitung des Erregers und eine symptomatische Erkrankung über lange Zeit verhindert. NK-Zellen besitzen hierbei nur eine untergeordnete Funktion. Es bleibt jedoch zu untersuchen, welche Zellpopulationen letztlich die lang anhaltende Kontrolle der *R. typhi*-Infektion vermitteln und für die frühe Zytokinfreisetzung, insbesondere von  $\text{IFN}\gamma$ , in RAG1 KO Mäusen verantwortlich sind. Aufschluss darüber würde die durchflusszytometrische Analyse einzelner Zellpopulationen auf die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  geben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zudem auf eine wichtige Funktion der Makrophagen in der *R. typhi*-Infektion hin. Die Depletion von Makrophagen in RAG1 KO Mäusen könnte zeigen, ob diese Zellen zum einen für die Kontrolle der Infektion essentiell sind und zum anderen, durch die Analyse der Zytokinkonzentrationen im Plasma der Mäuse, welchen Beitrag sie an der Zytokinantwort haben. Zusätzlich wäre von Interesse die Bedeutung der untersuchten Zytokine bei der Abwehr von *R. typhi*, insbesondere des dominierenden  $\text{IFN}\gamma$ , zu untersuchen. In welchem Maß einzelne Zytokine wie  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  zum Infektionsverlauf beitragen, könnte durch die Applikation entsprechender neutralisierender Antikörper untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verpaarung von RAG1 KO Mäusen mit entsprechenden Zytokin KO Mäusen, wie  $\text{IFN}\gamma$  KO oder  $\text{TNF}\alpha$  KO.

Eine Restimulation von Zellen aus verschiedenen Organen, vor allem des Gehirns, und die anschließende durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion einzelner Zellpopulationen, könnte außerdem detailliert Aufschluss über eine lokale Inflammation und der daran beteiligten Zellen geben.

Im Gegensatz zu RAG1 KO Mäusen ist das angeborene Immunsystem der CB17 SCID Mäusen nicht in der Lage, die Infektion zu kontrollieren, und es kommt zu einer frühen Dissemination des Erregers in alle Organe. Im Infektionsverlauf entwickeln diese Mäuse zudem eine starke Inflammation, die wahrscheinlich ursächlich für den Tod der Tiere ist. Die Aktivität von Neutrophilen konnte als Ursache für den Leberschaden in CB17 SCID Mäusen identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Neutrophile im Blut dieser Mäuse ROS freisetzen und in der Leber vermehrt iNOS nach Infektion exprimieren. Welche Faktoren tatsächlich lokal von Neutrophilen in der Leber freigesetzt werden und zu der Schädigung des Organs beitragen, wäre von Interesse. Neben der Freisetzung von ROS und NO entlassen Neutrophile nach Aktivierung aus ihren Granula eine Reihe weiterer Effektormoleküle wie Myeloperoxidase (MPO), Laktoferrin und andere, die dabei gemessen werden könnten. Schließlich könnte die Verpaarung der CB17 SCID Maus mit KO Mäusen (z.B. MPO KO, iNOS KO) die Bedeutung dieser Moleküle für die Schädigung der Leber durch Neutrophile in dieser Infektion zeigen.

Auch in CB17 SCID Mäusen dominierte  $\text{IFN}\gamma$  die Zytokinantwort. Daneben waren Zytokine wie IL-6, IL-12 und  $\text{TNF}\alpha$  messbar, die in erster Linie von Makrophagen produziert werden. Eine durchfluss-

#### 4 Diskussion

zytometrische Analyse der Zytokinfreisetzung in NK Zellen, Makrophagen und Neutrophilen würde Aufschluss darüber geben, welche Zellen für die starke Inflammation in CB17 SCID Mäusen verantwortlich sind.

Sowohl CB17 SCID als auch RAG1 KO Mäuse sterben schließlich infolge der Infektion. Dies zeigt, dass letztlich nur die adaptive Immunantwort einen langfristigen Schutz vermitteln kann. Besonders interessant wäre es deshalb, die Bedeutung insbesondere von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>, aber auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen, bei der Abwehr von *R. typhi* zu untersuchen. Beide in dieser Arbeit etablierten Infektionsmodelle sind für diese Untersuchungen gut geeignet, da durch den Transfer isolierter CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> oder B-Zellen ganz gezielt der Beitrag dieser Zellpopulationen zum Schutz ermittelt werden kann. Diese Transferexperimente können zudem zeigen, welche Zellpopulationen welche Form der Pathologie verhindern können. Vorläufige Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zeigen, dass nicht nur CD8<sup>+</sup>, sondern auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, diesen Schutz vermitteln können. Zudem stehen verschiedene Knockout-Mäuse wie IFN $\gamma$  KO, Perforin KO und andere zur Verfügung. Der Transfer von T-Zellen aus diesen Tieren in RAG1 KO oder CB17 SCID wird zusätzlich konkrete Aussagen über die zum Schutz benötigten Mechanismen der einzelnen Zellpopulationen erlauben.

Ein besseres Verständnis über die Immunmechanismen die zur Pathologie und zum Schutz während einer *R. typhi*-Infektion beitragen, kann helfen in Endemiegebieten Behandlungsmöglichkeiten zu verbessern, eine Vakzine zu entwickeln und präzisere diagnostische Methoden zu etablieren.

# Zusammenfassung

*R. typhi* ist ein humanpathogenes obligat intrazelluläres Bakterium und der Erreger des endemischen Fleckfiebers. Diese Erkrankung ist weltweit verbreitet, und eine Zunahme der Fallzahlen war in den letzten Jahren zu verzeichnen. Im Allgemeinen verläuft die Infektion mit *R. typhi* ohne Komplikationen und mit nur milden Symptomen wie Fieber, Übelkeit sowie Kopf- und Gliederschmerzen. Dennoch kommt es in einigen Fällen zu einer Ausbreitung der Infektion und zu schweren Erkrankungen wie interstitieller Pneumonie, Enzephalitis und Leberfunktionsstörungen. Ohne Behandlung mit Antibiotika verläuft die Infektion schätzungsweise in 1 bis 5 % dieser Fälle tödlich. Eine Vakzine ist noch nicht verfügbar. Trotz der möglichen schweren Komplikationen und der weltweiten Verbreitung von endemischem Fleckfieber ist noch wenig über die Immunantwort gegen den Erreger bekannt. Für die Entwicklung geeigneter diagnostischer Tests, eines Impfstoffes aber auch besserer Behandlungsmöglichkeiten ist ein detailliertes Verständnis der Immunantwort und der Mechanismen die zum Schutz und/oder aber zur Pathologie beitragen essentiell. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die angeborene Immunität gegen *R. typhi* in einem Mausmodell charakterisiert und dabei auch untersucht werden, ob angeborene Immunmechanismen zu der Pathologie beitragen.

Für die Analyse der angeborenen Immunität wurden C57BL/6 und BALB/c Mäuse sowie entsprechende B- und T-Zell-defiziente RAG1 KO (C57BL/6) und CB17 SCID (BALB/c) Mäuse derselben Stämme infiziert und auf die Entwicklung einer Erkrankung sowie pathologische Veränderungen untersucht. C57BL/6 Mäuse waren resistent gegenüber der Infektion mit *R. typhi* und entwickelten nur einen transienten Leberschaden. RAG1 KO Mäuse des C57BL/6 Stammes entwickelten überraschenderweise ebenfalls weder eine symptomatische Erkrankung noch eine detektierbare Bakterienlast in der initialen Phase der Infektion und überlebten diese für mehrere Monate. Diese Mäuse wiesen bereits an Tag 3 Höchstwerte aller untersuchten Zytokine, insbesondere  $\text{IFN}\gamma$  aber auch MCP-1 und IL-6, im Plasma auf, was zudem mit einem vorübergehenden leichten Anstieg der Monozyten/Makrophagen korrelierte. Erst 3 bis 4 Monate nach Infektion waren in RAG 1 Mäusen Bakterien hauptsächlich im Gehirn nachweisbar. Diese Mäuse verstarben an den Folgen einer Gehirnentzündung. Mäuse des C57BL/6 Stammes besitzen demnach eine potente angeborene Immunantwort, welche über einen langen Zeitraum vor der Ausbreitung der Bakterien in der Peripherie schützen kann. Dabei haben NK-Zellen nur eine untergeordnete Funktion, so dass der Schutz wahrscheinlich durch die antibakterielle Aktivität der Makrophagen vermittelt wird. Im Gegensatz dazu waren CB17 SCID Mäuse des BALB/c Stammes hochsuszeptibel für die Infektion, entwickelten bereits nach einer Woche schwere Symptome und verstarben an den Folgen der Erkrankung innerhalb von 3 Wochen. Anders als in RAG1 KO Mäusen disseminierte *R. typhi* innerhalb dieser Zeit in alle untersuchten Organe. Die Infektion war außerdem begleitet von schweren Organschäden, insbesondere der Leber, sowie von einer starken systemischen Inflammation. Vor allem zeigte sich eine hohe Konzentration von  $\text{IFN}\gamma$ , aber auch IL-6, MCP-1,  $\text{TNF}\alpha$

## Zusammenfassung

und IL-12, über den Infektionsverlauf im Plasma. Der Anstieg der Zytokine korrelierte mit der Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen in der Milz und Leber. Die Zunahme dieser Zellen war ursächlich für die Entwicklung einer Splenomegalie in CB17 SCID Mäusen. Sowohl Neutrophile als auch Monozyten/Makrophagen phagozytierten *R. typhi* und zeigten einen aktivierten antibakteriellen Phänotyp in der Milz und Leber, der durch die Expression von iNOS und die Freisetzung von ROS charakterisiert war. Die in CB17 SCID Mäusen auftretende Lebernekrose konnte jedoch allein auf die immunpathologische Aktivität der Neutrophilen zurückgeführt werden. Letztlich verstarben diese Mäuse vermutlich an den Folgen einer überschießenden Inflammation, die wahrscheinlich auf der Aktivität von Makrophagen beruht. Überraschenderweise korrelierte die Aktivierung dieser Zellen jedoch nicht mit der Phagozytose von *R. typhi*. Darüber hinaus reagierten Makrophagen *in vitro* auf *R. typhi* weder mit der Freisetzung von Zytokinen noch der verstärkten Expression von MHC- oder kostimulatorischen Molekülen. *R. typhi* aktiviert Makrophagen daher nicht direkt auf klassische Weise und wird wahrscheinlich nicht von klassischen PRRs wie TLRs erkannt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Makrophagen *in vivo* vielmehr indirekt über endogene Gefahrensignale infizierter und/oder geschädigter Zellen bzw. freigesetzte Zytokine aktiviert werden, als durch den Erreger selbst. Diese Ergebnisse zeigen, dass das angeborene Immunsystem von Mäusen des BALB/c Stammes die Infektion mit *R. typhi* nicht kontrollieren kann und bereits früh zur Pathologie beiträgt. Zusammenfassend deuten die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Stamm-spezifische zelluläre Ausstattung sowie die Qualität der angeborenen Immunantwort den unterschiedlichen Infektionsverlauf und die Pathologie in RAG1 KO und CB17 SCID Mäusen bestimmen. Für einen langanhaltenden Schutz gegenüber einer *R. typhi*-Infektion ist jedoch eine effiziente B- und T-Zell-vermittelte Immunität essentiell.

# Abstract

*R. typhi* is an obligate intracellular Gram-negative bacterium, causing endemic typhus in humans. This disease is worldwide distributed with increasing cases during the last years. Endemic typhus is accompanied by high fever, abdominal pain, nausea and vomiting. Although the course of disease is usually mild, disseminated infection can cause severe complications such as interstitial pneumonia, encephalitis, nephritis and liver dysfunction. If left untreated with antibiotics the lethality is estimated to be 1 to 5 %. However, to date endemic typhus is still highly underdiagnosed and a vaccine is not available. Moreover, little is known about mechanisms underlying pathology of this disease, reflecting the importance of understanding the immune response to *R. typhi*. Therefore, the aim of this PhD thesis was to investigate innate immune mechanisms that contribute to protection and to pathology in a murine model of *R. typhi* infection.

For these analyses T and B cell-deficient RAG1 KO (C57BL/6) and CB17 SCID (BALB/c) as well as corresponding wildtype mice were infected with *R. typhi*. Disease and pathology was assessed and innate immune response was characterized. RAG1 KO mice surprisingly developed neither a symptomatic disease nor detectable bacterial burden and survived the initial phase of infection. Inflammatory cytokines, especially IFN $\gamma$  but also IL-6 and MCP-1, peaked around day 3 post infection and were associated with temporary increase of monocytes/macrophages as well as of neutrophils. 3 to 4 month post infection RAG1 KO mice, however, developed bacterial burden mainly in the brain and succumbed to lethal neurological disorders due to brain inflammation. Thus, mice of the C57BL/6 strain possess an efficient innate immune response that is capable to protect mice from disseminated *R. typhi* infection in the periphery for a long period of time. NK cells were not responsible for this protection, suggesting efficient antibacterial activity of macrophages. In comparison, CB17 SCID mice were highly susceptible to *R. typhi* infection and died within 3 weeks. In these mice, *R. typhi* disseminated into all organs during the course of infection. Moreover, these mice developed a strong systemic inflammation characterized by high amounts of inflammatory cytokines such as IFN $\gamma$ , IL-6 and MCP-1 as well as TNF $\alpha$  and IL-12 compared with control mice. The ongoing and increasing inflammatory response correlated with an increasing number of monocytes/macrophages and neutrophils in the spleen and liver of affected mice. Furthermore, the accumulation of these cells was responsible for the development of a splenomegaly. Both, monocytes/macrophages and neutrophils harbored *R. typhi* and showed a bactericidal phenotype, characterized by the expression of iNOS and the release of ROS. These cell populations infiltrated the liver but solely neutrophils were found to be responsible for severe liver necrosis in CB17 SCID mice. Thus, liver necrosis is due to the immune pathological activity of neutrophils. Interestingly, activation of monocytes/macrophages and neutrophils did not correlate with bacterial uptake. Moreover, *R. typhi* did not activate macrophages *in vitro* to release cytokines or upregulate MHC or costimulatory molecules. These observations suggest that *R. typhi* is not conventionally re-

## *Abstract*

cognized by PRRs such as TLRs. Therefore, activation of these cells *in vivo* might be mediated by other factors such as endogenous danger signals released by infected and/or damaged cells or cytokines rather than *R. typhi* itself. Thus, innate immune mechanisms of mice of the BALB/c strain are not capable to control the infection and clearly contribute to pathology in these mice. Furthermore, the different outcome of *R. typhi* infection in RAG1 KO and CB17 SCID mice suggest, that the course of disease is determined by the cellular composition and quality of innate immunity which is based on strain-specific genetic background. However, for long-term protection against *R. typhi* an efficient adaptive immune response is essential.

# Literaturverzeichnis

- [1] H Rus, C Cudrici, and F Niculescu. The role of the complement system in innate immunity. *Immunologic research*, 33(2):103–12, January 2005.
- [2] S E Kirwan and D N Burshtyn. Regulation of natural killer cell activity. *Current opinion in immunology*, 19(1):46–54, February 2007.
- [3] S Gordon. The macrophage: Past, present and future. *European Journal of Immunology*, 37(S1):S9–S17, November 2007.
- [4] J A Smith. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of leukocyte biology*, 56(6):672–86, December 1994.
- [5] T Ohteki. The Dynamics of Dendritic Cell-Mediated Innate Immune Regulation. *Allergology International*, 56(3):209–214, September 2007.
- [6] C Grégoire, L Chasson, C Luci, El Tomasello, F Geissmann, E Vivier, and T Walzer. The trafficking of natural killer cells. *Immunological reviews*, 220:169–82, December 2007.
- [7] M V Clement, P Haddad, A Soulie, J Guillet, and M Sasportes. Involvement of granzyme B and perforin gene expression in the lytic potential of human natural killer cells. *Nouvelle revue française d'hématologie*, 32(5):349–52, January 1990.
- [8] E R Podack, D M Lowrey, M Lichtenheld, and A Hameed. Function of granule perforin and esterases in T cell-mediated reactions. Components required for delivery of molecules to target cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 532:292–302, January 1988.
- [9] D Pende, C Cantoni, P Rivera, M Vitale, R Castriconi, S Marcenaro, M Nanni, R Biassoni, C Bottino, A Moretta, and L Moretta. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *European journal of immunology*, 31(4):1076–86, April 2001.
- [10] D Cosman, J Müllberg, C L Sutherland, W Chin, R Armitage, W Fanslow, M Kubin, and N J Chalupny. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 14(2):123–33, February 2001.
- [11] J A Trapani and M J Smyth. Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation. *Immunology and cell biology*, 71 (Pt 3):201–8, June 1993.
- [12] Eric Vivier, David H Raullet, Alessandro Moretta, Michael A Caligiuri, Laurence Zitvogel, Lewis L Lanier, Wayne M Yokoyama, and Sophie Ugolini. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6013):44–9, January 2011.

- [13] C Nathan. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology*, 6(3):173–82, March 2006.
- [14] J A Hamilton and G P Anderson. GM-CSF Biology. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 22(4):225–31, December 2004.
- [15] J A Hamilton. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology*, 8(7):533–44, July 2008.
- [16] D Metcalf. Hematopoietic cytokines. *Blood*, 111(2):485–91, January 2008.
- [17] R Xu, H Huang, Z Zhang, and F-S Wang. The role of neutrophils in the development of liver diseases. *Cellular & molecular immunology*, 11(3):224–31, May 2014.
- [18] Chrisovalantou Cheretakis, Roland Leung, Chun Xiang Sun, Yigal Dror, and Michael Glogauer. Timing of neutrophil tissue repopulation predicts restoration of innate immune protection in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*, 108(8):2821–6, October 2006.
- [19] E Kolaczkowska and P Kubes. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 13(3):159–75, March 2013.
- [20] D R Barreda, PC Hanington, and M Belosevic. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental and comparative immunology*, 28(5):509–54, May 2004.
- [21] H Sengelov. Complement receptors in neutrophils. *Critical reviews in immunology*, 15(2):107–31, January 1995.
- [22] M Faurschou and N Borregaard. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 5(14):1317–27, November 2003.
- [23] N Borregaard and J B Cowland. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89(10):3503–21, May 1997.
- [24] S J Klebanoff. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology*, 77(5):598–625, May 2005.
- [25] M B Hampton, A J Kettle, and C C Winterbourn. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9):3007–17, November 1998.
- [26] B M Babior, J T Curnutte, and B J McMurrich. The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *The Journal of clinical investigation*, 58(4):989–96, October 1976.
- [27] L R Prince, M K Whyte, I Sabroe, and L C Parker. The role of TLRs in neutrophil activation. *Current opinion in pharmacology*, 11(4):397–403, August 2011.
- [28] I Ginsburg. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *Journal of leukocyte biology*, 63(4):518–9, April 1998.
- [29] H Jaeschke and C W Smith. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *Journal of leukocyte biology*, 61(6):647–53, June 1997.
- [30] J M Holman and T M Saba. Hepatocyte injury during post-operative sepsis: activated neutrophils as potential mediators. *Journal of leukocyte biology*, 43(3):193–203, March 1988.

- [31] R E Mebius and G Kraal. Structure and function of the spleen. *Nature reviews. Immunology*, 5(8):606–16, August 2005.
- [32] Florent Ginhoux, Shawn Lim, Guillaume Hoeffel, Donovan Low, and Tara Huber. Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7:45, January 2013.
- [33] Simon Yona, Ki-Wook Kim, Yochai Wolf, Alexander Mildner, Diana Varol, Michal Breker, Dalit Strauss-Ayali, Sergey Viukov, Martin Williams, Alexander Misharin, David A Hume, Harris Perlman, Bernard Malissen, Elazar Zelzer, and Steffen Jung. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1):79–91, January 2013.
- [34] Christian Schulz, Elisa Gomez Perdiguero, Laurent Chorro, Heather Szabo-Rogers, Nicolas Carnaud, Katrin Kierdorf, Marco Prinz, Bishan Wu, Sten Eirik W Jacobsen, Jeffrey W Pollard, Jon Frampton, Karen J Liu, and Frederic Geissmann. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6077):86–90, April 2012.
- [35] Guillaume Hoeffel, Yilin Wang, Melanie Greter, Peter See, Pearline Teo, Benoit Malleret, Marylène Leboeuf, Donovan Low, Guillaume Oller, Francisca Almeida, Sharon H Y Choy, Marcos Grisotto, Laurent Renia, Simon J Conway, E Richard Stanley, Jerry K Y Chan, Lai Guan Ng, Igor M Samokhvalov, Miriam Merad, and Florent Ginhoux. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 209(6):1167–81, June 2012.
- [36] Daigo Hashimoto, Andrew Chow, Clara Noizat, Pearline Teo, Mary Beth Beasley, Marylene Leboeuf, Christian D Becker, Peter See, Jeremy Price, Daniel Lucas, Melanie Greter, Arthur Mortha, Scott W Boyer, E Camilla Forsberg, Masato Tanaka, Nico van Rooijen, Adolfo García-Sastre, E Richard Stanley, Florent Ginhoux, Paul S Frenette, and Miriam Merad. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 38(4):792–804, April 2013.
- [37] Michael H Sieweke and Judith E Allen. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6161):1242974, November 2013.
- [38] R T Palframan, S Jung, G Cheng, W Weninger, Y Luo, M Dorf, D R Littman, B J Rollins, H Zweerink, A Rot, and U H von Andrian. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *The Journal of experimental medicine*, 194(9):1361–73, November 2001.
- [39] M N Ajuebor, R J Flower, R Hannon, M Christie, K Bowers, A Verity, and M Perretti. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *Journal of leukocyte biology*, 63(1):108–16, January 1998.
- [40] S L Deshmane, S Kremlev, S Amini, and B E Sawaya. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(6):313–26, June 2009.
- [41] S Gordon. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7):927–30, December 2002.

- [42] C A Janeway and R Medzhitov. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20:197–216, January 2002.
- [43] Taro Kawai and Shizuo Akira. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine*, 13(11):460–9, November 2007.
- [44] W K Alderton, C E Cooper, and R G Knowles. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*, 357(Pt 3):593–615, August 2001.
- [45] J MacMicking, Q W Xie, and C Nathan. Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*, 15:323–50, January 1997.
- [46] C Nathan and M U Shiloh. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16):8841–8, August 2000.
- [47] R Medzhitov. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 1(2):135–45, November 2001.
- [48] P D Stahl and R A Ezekowitz. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current opinion in immunology*, 10(1):50–5, February 1998.
- [49] M C Carroll. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annual review of immunology*, 16:545–68, January 1998.
- [50] K. K. Huynh and S. Grinstein. Regulation of Vacuolar pH and Its Modulation by Some Microbial Species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3):452–462, September 2007.
- [51] Pontus Nordenfelt and Hans Tapper. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 90(2):271–84, August 2011.
- [52] M Cohn, N A Mitchison, W E Paul, A M Silverstein, D W Talmage, and M Weigert. Reflections on the clonal-selection theory. *Nature reviews. Immunology*, 7(10):823–30, October 2007.
- [53] D Jung, C Giallourakis, R Mostoslavsky, and F W Alt. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annual review of immunology*, 24:541–70, January 2006.
- [54] G F Mitchell. Selection, memory and selective memories: T cells, B cells and Sir Mac 1968. *Immunology and cell biology*, 86(1):26–30, January 2008.
- [55] C V Harding. Class I MHC presentation of exogenous antigens. *Journal of clinical immunology*, 16(2):90–6, March 1996.
- [56] S Nagata. Fas-mediated apoptosis. *Advances in experimental medicine and biology*, 406:119–24, January 1996.
- [57] M R Alderson, T W Tough, T Davis-Smith, S Braddy, B Falk, K A Schooley, R G Goodwin, C A Smith, F Ramsdell, and D H Lynch. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 181(1):71–7, January 1995.
- [58] Mads Hald Andersen, David Schrama, Per Thor Straten, and Jürgen C Becker. Cytotoxic T cells. *The Journal of investigative dermatology*, 126(1):32–41, January 2006.
- [59] Abul K. Abbas, Andrew H. H. Lichtman, and Shiv Pillai. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, 7 edition, 2011.

- [60] John J O’Shea and William E Paul. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5969):1098–102, February 2010.
- [61] H T Ricketts. The transmission of rocky mountain spotted fever by the bite of the wood-tick (dermacentor occidentalis). *Journal of the American Medical Association*, 47(5):358–358, 1906.
- [62] A F Azad and C B Beard. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging infectious diseases*, 4(2):179–86, 1998.
- [63] D H Walker, G A Valbuena, and J P Olano. Pathogenic Mechanisms of Diseases Caused by Rickettsia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1):1–11, June 2003.
- [64] D Raoult and V Roux. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 10(4):694–719, October 1997.
- [65] A Tamura, N Ohashi, H Urakami, and S Miyamura. Classification of Rickettsia tsutsugamushi in a new genus, Orientia gen. nov., as Orientia tsutsugamushi comb. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 45(3):589–91, July 1995.
- [66] G Dobler and W Roman. Deutsches Ärzteblatt: Fleckfieber und andere Rickettsiosen (15.05.2009). *Deutsches Ärzteblatt*, 106(20):348–354, 2009.
- [67] T Uchiyama. Tropism and pathogenicity of rickettsiae. *Frontiers in microbiology*, 3:230, January 2012.
- [68] S. B. Wolbach and J. L. Todd. Note sur l’etiologie et l’anatomie pathologique du typhus exanthematique au Mexique. *Annales de l’Institut Pasteur*, 34:158, 1920.
- [69] H da Rocha Lima. Zur Aetiologie des Fleckfiebers. *Berliner klinische Wochenschrift*, 53:567–569, 1916.
- [70] M Fodorová, P Vadovič, and R Toman. Structural features of lipid A of Rickettsia typhi. *Acta virologica*, 55(1):31–44, January 2011.
- [71] M Fodorova, P Vadovic, L Skultety, K Slaba, and R Toman. Structural features of lipopolysaccharide from Rickettsia typhi: the causative agent of endemic typhus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1063:259–60, December 2005.
- [72] K I Amano, J C Williams, and G a Dasch. Structural properties of lipopolysaccharides from Rickettsia typhi and Rickettsia prowazekii and their chemical similarity to the lipopolysaccharide from Proteus vulgaris OX19 used in the Weil-Felix test. *Infection and immunity*, 66(3):923–6, March 1998.
- [73] S Schramek, R Brezina, and J Kazár. Some biological properties of an endotoxic lipopolysaccharide from the typhus group rickettsiae. *Acta virologica*, 21(5):439–41, September 1977.
- [74] E Weiss. The biology of rickettsiae. *Annual review of microbiology*, 36:345–70, January 1982.
- [75] M P McLeod, X Qin, SE Karpathy, J Gioia, S K Highlander, G E Fox, T Z McNeill, H Jiang, D Muzny, L S Jacob, Al C Hawes, E Sodergren, R Gill, J Hume, M Morgan, G Fan, A G Amin, R A Gibbs, C Hong, X-J Yu, D H Walker, and G M Weinstock. Complete genome sequence of Rickettsia typhi and comparison with sequences of other rickettsiae. *Journal of bacteriology*, 186(17):5842–55, September 2004.

Literaturverzeichnis

- [76] S G Andersson, A Zomorodipour, J O Andersson, T Sicheritz-Pontén, U C Alsmark, R M Podowski, A K Näslund, A S Eriksson, H H Winkler, and C G Kurland. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 396(6707):133–40, November 1998.
- [77] J O Andersson and S G Andersson. A century of typhus, lice and *Rickettsia*. *Research in microbiology*, 151(2):143–50, March 2000.
- [78] R J Duma, D E Sonenshine, F M Bozeman, J M Veazey, B L Elisberg, D P Chadwick, N I Stocks, T M McGill, G B Miller, and J N MacCormack. Epidemic typhus in the United States associated with flying squirrels. *The Journal of the American Medical Association*, 245(22):2318–23, June 1981.
- [79] J D Baxter. The typhus group. *Clinics in Dermatology*, 14(3):271–278, 1996.
- [80] M E Eremeeva, W R Warashina, M M Sturgeon, A E Buchholz, G K Olmsted, S Y Park, P V Effler, and S E Karpathy. *Rickettsia typhi* and *R. felis* in rat fleas (*Xenopsylla cheopis*), Oahu, Hawaii. *Emerging infectious diseases*, 14(10):1613–5, October 2008.
- [81] A F Azad. Epidemiology of murine typhus. *Annual review of entomology*, 35:553–69, January 1990.
- [82] H B Morlan, E L Hill, and J H Schubert. Serological survey for murine typhus infection in southwest Georgia animals. *Public health reports*, 65(2):57–63, January 1950.
- [83] A Farhang-Azad, R Traub, and S Baqar. Transovarial transmission of murine typhus rickettsiae in *Xenopsylla cheopis* fleas. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4686):543–5, February 1985.
- [84] Y Tselentis and A Gikas. Murine typhus. In *Rickettsial Diseases*, page 37. 2007.
- [85] D Raoult, J B Ndiokubwayo, H Tissot-Dupont, V Roux, B Faugere, R Abegbinni, and R J Birtles. Outbreak of epidemic typhus associated with trench fever in Burundi. *Lancet (London, England)*, 352(9125):353–8, August 1998.
- [86] D Raoult, R J Birtles, M Montoya, E Perez, H Tissot-Dupont, V Roux, and H Guerra. Survey of three bacterial louse-associated diseases among rural Andean communities in Peru: prevalence of epidemic typhus, trench fever, and relapsing fever. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 29(2):434–6, August 1999.
- [87] K Mokrani, P E Fournier, M Dalichaouche, S Tebbal, A Aouati, and D Raoult. Reemerging threat of epidemic typhus in Algeria. *Journal of clinical microbiology*, 42(8):3898–900, August 2004.
- [88] I Tarasevich, E Rydkina, and D Raoult. Outbreak of epidemic typhus in Russia. *Lancet (London, England)*, 352(9134):1151, October 1998.
- [89] R Traub and C L Wisseman. The ecology of murine typhus—a critical review. *Tropical diseases bulletin*, 75(4):237–317, April 1978.
- [90] Center of Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of Murine Typhus - Texas. Technical report, 1983.
- [91] Center of Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of *Rickettsia typhi* Infection - Austin, Texas, 2008. Technical report, 2009.

- [92] A O Letaïef, N Kaabia, M Chakroun, M Khalifa, N Bouzouaia, and L Jemni. Clinical and laboratory features of murine typhus in central Tunisia: a report of seven cases. *International Journal of Infectious Diseases*, 9(6):331–334, November 2005.
- [93] M. Koliou, A. Psaroulaki, C. Georgiou, I. Ioannou, Y. Tselentis, and A. Gikas. Murine typhus in Cyprus: 21 paediatric cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(7):491–493, June 2007.
- [94] J Adjemian, S Parks, K McElroy, J Campbell, M E Ereemeeva, W L Nicholson, J McQuiston, and J Taylor. Murine typhus in Austin, Texas, USA, 2008. *Emerging infectious diseases*, 16(3):412–7, March 2010.
- [95] M Hidalgo, V Montoya, A Martínez, M Mercado, A De la Ossa, C Vélez, G Estrada, J E Pérez, A A Faccini-Martínez, M B Labruna, and G Valbuena. Flea-borne rickettsioses in the north of Caldas province, Colombia. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 13(5):289–94, May 2013.
- [96] W K Reeves, K O Murray, T E Meyer, L M Bull, R F Pascua, K C Holmes, and A D Loftis. Serological evidence of typhus group rickettsia in a homeless population in Houston, Texas. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology*, 33(1):205–7, June 2008.
- [97] S Badiaga, S Benkouiten, H Hajji, D Raoult, and P Brouqui. Murine typhus in the homeless. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35(1):39–43, January 2012.
- [98] David H Walker and Nahed Ismail. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nature reviews. Microbiology*, 6(5):375–86, May 2008.
- [99] D R Anderson, H E Hopps, M F Barile, and B C Bernheim. Comparison of the ultrastructure of several rickettsiae, ornithosis virus, and Mycoplasma in tissue culture. *Journal of bacteriology*, 90(5):1387–404, November 1965.
- [100] D H Walker. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45 Suppl 1:S39–44, July 2007.
- [101] S Radulovic, J M Troyer, M S Beier, A O Lau, and A F Azad. Identification and molecular analysis of the gene encoding Rickettsia typhi hemolysin. *Infection and immunity*, 67(11):6104–8, November 1999.
- [102] D H Walker, H M Feng, and V L Popov. Rickettsial phospholipase A2 as a pathogenic mechanism in a model of cell injury by typhus and spotted fever group rickettsiae. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(6):936–42, December 2001.
- [103] T G Betz, J A Rawlings, J P Taylor, and B L Davis. Endemic typhus in Texas. *Texas medicine*, 79(11):48–53, November 1983.
- [104] J S Dumler, J P Taylor, and D H Walker. Clinical and laboratory features of murine typhus in south Texas, 1980 through 1987. *The Journal of the American Medical Association*, 266(10):1365–70, September 1991.
- [105] D H Walker, F M Parks, T G Betz, J P Taylor, and J W Muehlberger. Histopathology and

- immunohistologic demonstration of the distribution of *Rickettsia typhi* in fatal murine typhus. *American journal of clinical pathology*, 91(6):720–4, June 1989.
- [106] D Anyfantakis, S Doukakis, M Papadakis, D Triantafyllidou, K Bambili, G Polimili, and S Katsanakis. Liver function test abnormalities in murine typhus in Greece: a retrospective study of 165 cases. *Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive*, 21(3):207–10, September 2013.
- [107] A Gikas, S Doukakis, and J Padiaditis. Murine typhus in Greece: epidemiological, clinical, and therapeutic data from 83 cases. 96(3):250–253, 2002.
- [108] J Irwin, D Tredoux, and G Mills. Murine typhus and leptospirosis presenting with undifferentiated symptoms of an acute febrile illness to Waikato Hospital, New Zealand, 2009-2010. *The New Zealand medical journal*, 126(1374):56–66, May 2013.
- [109] R R Maude, H K de Jong, L Wijedoru, M Fukushima, A Ghose, R Samad, M A Hossain, M R Karim, M A Faiz, and C M Parry. The diagnostic accuracy of three rapid diagnostic tests for typhoid fever at Chittagong Medical College Hospital, Chittagong, Bangladesh. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 20(10):1376–84, October 2015.
- [110] R Fang, N Ismail, and L Soong. Differential interaction of dendritic cells with *Rickettsia conorii*: Impact on host susceptibility to murine spotted fever rickettsiosis. 75(6):3112–3123, 2007.
- [111] A N Billings, H M Feng, J P Olano, and D H Walker. Rickettsial infection in murine models activates an early anti-rickettsial effect mediated by NK cells and associated with production of gamma interferon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(1):52–6, July 2001.
- [112] C A Nacy and M G Groves. Macrophages in resistance to rickettsial infections: early host defense mechanisms in experimental scrub typhus. *Infection and immunity*, 31(3):1239–50, March 1981.
- [113] C A Nacy and M S Meltzer. Macrophages in resistance to rickettsial infection: macrophage activation in vitro for killing of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 123(6):2544–9, December 1979.
- [114] M G Groves and J V Osterman. Host defenses in experimental scrub typhus: genetics of natural resistance to infection. *Infection and immunity*, 19(2):583–8, March 1978.
- [115] H M Feng, V L Popov, and D H Walker. 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*, 62(5):1952–60, May 1994.
- [116] D H Walker, V L Popov, and H M Feng. Establishment of a novel endothelial target mouse model of a typhus group rickettsiosis: evidence for critical roles for gamma interferon and CD8 T lymphocytes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80(9):1361–72, September 2000.
- [117] D H Walker, V L Popov, P A Crocquet-Valdes, C J Welsh, and H M Feng. Cytokine-induced, nitric oxide-dependent, intracellular antirickettsial activity of mouse endothelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 76(1):129–38, January 1997.

- [118] D H Walker, J P Olano, and H M Feng. Critical role of cytotoxic T lymphocytes in immune clearance of rickettsial infection. *Infection and immunity*, 69(3):1841–6, March 2001.
- [119] F Parker and F A Neva. Studies on the toxicity of typhus rickettsiae. II. Pathologic findings in white rats and white mice. *The American journal of pathology*, 30(2):215–37, January 1955.
- [120] Y Bechah, C Capo, G E Grau, D Raoult, and J L Mege. A murine model of infection with *Rickettsia prowazekii*: implications for pathogenesis of epidemic typhus. *Microbes and Infection*, 9(7):898–906, June 2007.
- [121] J R Murphy, C L Wisseman, and P Fiset. Mechanisms of immunity in typhus infection: analysis of immunity to *Rickettsia mooseri* infection of guinea pigs. *Infection and immunity*, 27(3):730–8, March 1980.
- [122] J R Murphy, C L Wisseman, and P Fiset. Mechanisms of immunity in typhus infection: some characteristics of *Rickettsia mooseri* infection of guinea pigs. *Infection and immunity*, 21(2):417–24, August 1978.
- [123] S Arango-Jaramillo, A Farhang-Azad, and C L Wisseman. Experimental infection with *Rickettsia mooseri* and antibody response of adult and newborn laboratory rats. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 33(5):1017–25, September 1984.
- [124] A E Crist, C L Wisseman, and J R Murphy. Characteristics of *Rickettsia mooseri* infection of normal and immune mice. *Infection and immunity*, 43(1):38–42, January 1984.
- [125] Jeffrey M Jordan, Michael E Woods, Juan Olano, and David H Walker. The absence of Toll-like receptor 4 signaling in C3H/HeJ mice predisposes them to overwhelming rickettsial infection and decreased protective Th1 responses. *Infection and immunity*, 76(8):3717–24, August 2008.
- [126] P Mombaerts, J Iacomini, R S Johnson, K Herrup, S Tonegawa, and V E Papaioannou. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 68(5):869–77, March 1992.
- [127] G C Bosma, M T Davisson, N R Ruetsch, H O Sweet, L D Shultz, and M J Bosma. The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. *Immunogenetics*, 29(1):54–7, January 1989.
- [128] G C Bosma, R P Custer, and M J Bosma. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301(5900):527–30, March 1983.
- [129] R Fang, N Ismail, and D H Walker. Contribution of NK cells to the innate phase of host protection against an intracellular bacterium targeting systemic endothelium. *The American journal of pathology*, 181(1):185–95, July 2012.
- [130] H M Feng and D H Walker. Mechanisms of intracellular killing of *Rickettsia conorii* in infected human endothelial cells, hepatocytes, and macrophages. *Infection and immunity*, 68(12):6729–36, December 2000.
- [131] J Turco, H Liu, SF Gottlieb, and HH Winkler. Nitric oxide-mediated inhibition of the ability of *Rickettsia prowazekii* to infect mouse fibroblasts and mouse macrophagelike cells. *Infection and Immunity*, 66(2):558–566, February 1998.
- [132] E Gray, P Atatoa-Carr, and A Bell. Murine typhus: a newly recognised problem in the Waikato region of New Zealand. *The New Zealand medical journal*, 120(1259), 2007.

- [133] Shawn Rose, Alexander Misharin, and Harris Perlman. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 81(4):343–50, April 2012.
- [134] C S Eisemann, M J Nypaver, and J V Osterman. Susceptibility of inbred mice to rickettsiae of the spotted-fever group. *Infection and immunity*, 43(1):143–148, 1984.
- [135] A Osterloh, S Papp, K Moderzynski, S Kuehl, and U Richardt. Persisting *Rickettsia typhi* causes fatal central nervous system inflammation. *Infection and immunity. Eingereichtes Manuskript*, October, 2015.
- [136] W L Moy and S T Ooi. Abducens nerve palsy and meningitis by *Rickettsia typhi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 92(3):620–4, March 2015.
- [137] N G Simon, P D Cremer, and S R Graves. Murine typhus returns to New South Wales: a case of isolated meningoencephalitis with raised intracranial pressure. *The Medical journal of Australia*, 194(12):652–4, June 2011.
- [138] R Masalha, H Merkin-Zaborsky, M Matar, H J Zirkin, I Wirguin, and Y O Herishanu. Murine typhus presenting as subacute meningoencephalitis. *Journal of neurology*, 245(10):665–8, October 1998.
- [139] Y Samra, Y Shaked, and M K Maier. Delayed neurologic display in murine typhus. Report of two cases. *Archives of internal medicine*, 149(4):949–51, April 1989.
- [140] K Silpapojakul, C Ukkachoke, and S Krisanapan. Rickettsial meningitis and encephalitis. *Archives of internal medicine*, 151(9):1753–7, September 1991.
- [141] T P Bleck. Central nervous system involvement in Rickettsial diseases. *Neurologic clinics*, 17(4):801–12, November 1999.
- [142] G Trinchieri. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*, 84(12):4008–27, December 1994.
- [143] M Kobayashi, L Fitz, M Ryan, R M Hewick, S C Clark, S Chan, R Loudon, F Sherman, B Perussia, and G Trinchieri. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 170(3):827–45, September 1989.
- [144] P L Dunn and R J North. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infection and immunity*, 59(9):2892–900, September 1991.
- [145] G Valbuena, H M Feng, and D H Walker. Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 4(6):625–33, May 2002.
- [146] F Liu, J Poursine-Laurent, H Y Wu, and D C Link. Interleukin-6 and the granulocyte colony-stimulating factor receptor are major independent regulators of granulopoiesis in vivo but are not required for lineage commitment or terminal differentiation. *Blood*, 90(7):2583–90, October 1997.

- [147] S A Dalrymple, L A Lucian, R Slattery, T McNeil, D M Aud, S Fuchino, F Lee, and R Murray. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infection and immunity*, 63(6):2262–8, June 1995.
- [148] T Yoshimura, E A Robinson, S Tanaka, E Appella, and E J Leonard. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 142(6):1956–62, March 1989.
- [149] T Yoshimura, N Yuhki, S K Moore, E Appella, M I Lerman, and E J Leonard. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS letters*, 244(2):487–93, March 1989.
- [150] J L Stow, P C Low, C Offenhäuser, and D Sangermani. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunobiology*, 214(7):601–12, January 2009.
- [151] Z Xing, A Zganiacz, and M Santosuosso. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. *Journal of leukocyte biology*, 68(6):897–902, December 2000.
- [152] G Trinchieri. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual review of immunology*, 13:251–76, January 1995.
- [153] M Denis. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cellular immunology*, 132(1):150–7, January 1991.
- [154] S J Green, M S Meltzer, J B Hibbs, and C A Nacy. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 144(1):278–83, January 1990.
- [155] C F Nathan, H W Murray, M E Wiebe, and B Y Rubin. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of experimental medicine*, 158(3):670–89, September 1983.
- [156] D A Portnoy, R D Schreiber, P Connelly, and L G Tilney. Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *The Journal of experimental medicine*, 170(6):2141–6, December 1989.
- [157] M Hernández Cabrera, Al Angel-Moreno, E Santana, M Bolaños, A Francès, M-S Martín-Sánchez, and J Luis Pérez-Arellano. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. *Emerging infectious diseases*, 10(4):740–3, April 2004.
- [158] M Bernabeu-Wittel, J Pachón, A Alarcón, L F López-Cortés, P Viciano, M E Jiménez-Mejías, J L Villanueva, R Torronteras, and F J Caballero-Granado. Murine typhus as a common cause of fever of intermediate duration: a 17-year study in the south of Spain. *Archives of internal medicine*, 159(8):872–6, April 1999.

- [159] D H Walker, V L Popov, J Wen, and H M Feng. Rickettsia conorii infection of C3H/HeN mice. A model of endothelial-target rickettsiosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 70(3):358–68, March 1994.
- [160] C Cheers and I F McKenzie. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: genetics of listeriosis. *Infection and immunity*, 19(3):755–62, March 1978.
- [161] C Cheers, I F McKenzie, H Pavlov, C Waid, and J York. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: course of listeriosis in resistant or susceptible mice. *Infection and immunity*, 19(3):763–70, March 1978.
- [162] L Planelles, M C Thomas, C Marañón, M Morell, and M C López. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by Trypanosoma cruzi in APCs from resistant or susceptible mice. *Clinical and experimental immunology*, 131(1):41–7, January 2003.
- [163] F P Heinzl, M D Sadick, B J Holaday, R L Coffman, and R M Locksley. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of experimental medicine*, 169(1):59–72, January 1989.
- [164] F P Heinzl, M D Sadick, and R M Locksley. Leishmania major: analysis of lymphocyte and macrophage cellular phenotypes during infection of susceptible and resistant mice. *Experimental parasitology*, 65(2):258–68, April 1988.
- [165] T E Mandel and C Cheers. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. *Infection and immunity*, 30(3):851–61, December 1980.
- [166] P Scott, P Natovitz, R L Coffman, E Pearce, and A Sher. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *The Journal of experimental medicine*, 168(5):1675–84, November 1988.
- [167] H Watanabe, K Numata, T Ito, K Takagi, and A Matsukawa. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock (Augusta, Ga.)*, 22(5):460–6, November 2004.
- [168] C A Nacy and M S Meltzer. Macrophages in resistance to rickettsial infection: strains of mice susceptible to the lethal effects of Rickettsia akari show defective macrophage Rickettsicidal activity in vitro. *Infection and immunity*, 36(3):1096–101, June 1982.
- [169] S Gessani and F Belardelli. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine & growth factor reviews*, 9(2):117–23, June 1998.
- [170] D M Frucht, T Fukao, C Bogdan, H Schindler, J J O’Shea, and S Koyasu. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends in immunology*, 22(10):556–60, October 2001.
- [171] C M Robinson, D ODee, T Hamilton, and G J Nau. Cytokines Involved in Interferon gamma Production by Human Macrophages. *Journal of Innate Immunity*, 2(1):56–65, January 2010.
- [172] M J Fenton, M W Vermeulen, S Kim, M Burdick, R M Strieter, and H Kornfeld. Induction of

- gamma interferon production in human alveolar macrophages by Mycobacterium tuberculosis. *Infection and immunity*, 65(12):5149–56, December 1997.
- [173] M Munder, M Mallo, K Eichmann, and M Modolell. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *The Journal of experimental medicine*, 187(12):2103–8, June 1998.
- [174] P Puddu, L Fantuzzi, P Borghi, B Varano, G Rainaldi, E Guillemard, W Malorni, P Nicaise, S F Wolf, F Belardelli, and S Gessani. IL-12 induces IFN-gamma expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(7):3490–7, October 1997.
- [175] P Di Marzio, P Puddu, L Conti, F Belardelli, and S Gessani. Interferon gamma upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 179(5):1731–6, May 1994.
- [176] K Takeda and S Akira. Toll-like receptors. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*, 109:14.12.1–14.12.10, January 2015.
- [177] D J Stearns-Kurosawa, M F Osuchowski, C Valentine, S Kurosawa, and D G Remick. The pathogenesis of sepsis. *Annual review of pathology*, 6:19–48, January 2011.
- [178] B Beutler and E T Rietschel. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature reviews. Immunology*, 3(2):169–76, February 2003.
- [179] F C Fang. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *The Journal of clinical investigation*, 99(12):2818–25, June 1997.
- [180] J Chan, Y Xing, R S Magliozzo, and B R Bloom. Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 175(4):1111–22, April 1992.
- [181] M Denis. Involvement of cytokines in determining resistance and acquired immunity in murine tuberculosis. *Journal of leukocyte biology*, 50(5):495–501, November 1991.
- [182] S Dupré-Crochet, M Erard, and O Nüße. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of leukocyte biology*, 94(4):657–70, October 2013.
- [183] S Akira, K Takeda, and T Kaisho. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*, 2(8):675–80, August 2001.
- [184] D H Walker, S D Hudnall, W K Szaniawski, and H M Feng. Monoclonal antibody-based immunohistochemical diagnosis of rickettsialpox: the macrophage is the principal target. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 12(5):529–33, May 1999.
- [185] S. Radulovic. Rickettsia-Macrophage Interactions: Host Cell Responses to Rickettsia akari and Rickettsia typhi. *Infection and Immunity*, 70(5):2576–2582, May 2002.
- [186] L Beaman and C L Wisseman. Mechanisms of immunity in typhus infections. VI. Differential opsonizing and neutralizing action of human typhus rickettsia-specific cytophilic antibodies in cultures of human macrophages. *Infection and immunity*, 14(4):1071–6, October 1976.

- [187] X Zhang and D M Mosser. Macrophage activation by endogenous danger signals. *The Journal of pathology*, 214(2):161–78, January 2008.
- [188] A Osterloh and M Breloer. Heat shock proteins: linking danger and pathogen recognition. *Medical microbiology and immunology*, 197(1):1–8, March 2008.
- [189] S Gallucci and P Matzinger. Danger signals: SOS to the immune system. *Current opinion in immunology*, 13(1):114–9, February 2001.
- [190] W Chen, U Syldath, K Bellmann, V Burkart, and H Kolb. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(6):3212–9, March 1999.
- [191] A Krüttgen and S Rose-John. Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 32(2):60–5, February 2012.
- [192] M A Titheradge. Nitric oxide in septic shock. *Biochimica et biophysica acta*, 1411(2-3):437–55, May 1999.
- [193] K J Tracey and A Cerami. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual review of medicine*, 45:491–503, January 1994.
- [194] S H Gregory and E J Wing. Neutrophil-Kupffer-cell interaction in host defenses to systemic infections. *Immunology today*, 19(11):507–10, November 1998.
- [195] M Verdrengh and A Tarkowski. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 65(7):2517–21, July 1997.
- [196] R A Van Andel, R R Hook, C L Franklin, C L Besch-Williford, N van Rooijen, and L K Riley. Effects of neutrophil, natural killer cell, and macrophage depletion on murine *Clostridium piliforme* infection. *Infection and immunity*, 65(7):2725–31, July 1997.
- [197] J W Conlan. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infection and immunity*, 65(2):630–5, February 1997.
- [198] S H Gregory, A J Sagnimeni, and E J Wing. Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(6):2514–20, September 1996.
- [199] R P Schleimer, H S Freeland, S P Peters, K E Brown, and C P Derse. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B<sub>4</sub> by purified human neutrophils. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 250(2):598–605, August 1989.
- [200] A W Segal. How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology*, 23:197–223, January 2005.
- [201] J D MacMicking, R J North, R LaCourse, J S Mudgett, S K Shah, and C F Nathan. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10):5243–8, May 1997.

*Literaturverzeichnis*

- [202] A L Rakhmilevich. Neutrophils are essential for resolution of primary and secondary infection with *Listeria monocytogenes*. *Journal of leukocyte biology*, 57(6):827–31, June 1995.
- [203] C J Czuprynski, J F Brown, N Maroushek, R D Wagner, and H Steinberg. Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(4):1836–46, February 1994.
- [204] A Osterloh, F Geisinger, M Piédavent, B Fleischer, N Brattig, and M Breloer. Heat shock protein 60 (HSP60) stimulates neutrophil effector functions. *Journal of leukocyte biology*, 86(2):423–34, August 2009.
- [205] T Sato, H Shinzawa, Y Abe, T Takahashi, S Arai, and F Sendo. Inhibition of *Corynebacterium parvum*-primed and lipopolysaccharide-induced hepatic necrosis in rats by selective depletion of neutrophils using a monoclonal antibody. *Journal of leukocyte biology*, 53(2):144–50, February 1993.
- [206] Z E Suntres and P N Shek. Treatment of LPS-induced tissue injury: role of liposomal antioxidants. *Shock (Augusta, Ga.)*, 6 Suppl 1:S57–64, January 1996.
- [207] M Yamano, M Umeda, K Miyata, and T Yamada. Protective effects of a PAF receptor antagonist and a neutrophil elastase inhibitor on multiple organ failure induced by cerulein plus lipopolysaccharide in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 358(2):253–63, August 1998.