

Einfluss der negativen T-Zell-Kostimulation auf die  
CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Immunantwort in der  
experimentellen Infektion mit *Orientia tsutsugamushi*

Dissertation

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

vorgelegt von

**Stefanie Lilla**

(20.04.1984, Offenbach am Main)

Hamburg, Februar 2016

Tag der Disputation: 01.04.2016

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Fleischer

2. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Kehr

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internetquellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich bin damit einverstanden, dass die Doktorarbeit veröffentlicht wird.

Hamburg, den 09.02.1016

  
Stefanie Lilla

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	XI
Summary	XII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Orientia tsutsugamushi</i>	1
1.1.1 Taxonomie und Morphologie	1
1.1.2 Lebensweise von <i>Orientia tsutsugamushi</i>	2
1.1.3 Tsutsugamushi-Fieber - Symptome, Therapie und Epidemiologie einer humanen Infektion	5
1.1.4 Mausmodell	6
1.2 Effektormechanismen gegen intrazelluläre Erreger	7
1.3 Aktivierung und Regulation der T-Zell-Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien	8
1.3.1 T-Zell-Aktivierung	9
1.3.2 T-Zell-Regulation	13
1.3.3 T-Zell-Koinhibition	16
1.3.3.1 CTLA-4	16
1.3.3.2 PD-1	20
1.3.3.3 TIM-3	23
1.3.3.4 LAG-3	25
1.3.4 T-Zell-Gedächtnis (Memory)	26
1.4 IL-10 als anti-inflammatorisches Zytokin	27
1.5 Zielsetzung und Hypothese der Arbeit	28
<b>2 Material</b>	<b>30</b>
2.1 Laborgeräte	30
2.2 Verbrauchsmaterialien	31
2.3 Chemikalien und Reagenzien	31
2.3.1 Chemikalien und Reagenzien für zellbiologische Methoden	32
2.3.2 Chemikalien und Reagenzien für molekularbiologische Methoden	33

2.3.3	Antikörper . . . . .	33
2.4	<b>Bakterienstämme, Hybridom, Zelllinien, Mausstämme</b> . . . . .	34
2.5	<b>Kulturmedien, Puffer, Stammlösungen</b> . . . . .	36
2.5.1	Kulturmedien, Puffer, Stammlösungen für zellbiologische und tier-experimentelle Arbeiten . . . . .	36
2.5.2	Kulturmedien, Puffer, Stammlösungen für molekularbiologische Ar-beiten . . . . .	37
2.6	<b>Nukleinsäuren</b> . . . . .	38
2.7	<b>Software</b> . . . . .	38
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>39</b>
3.1	<b>Zellbiologische Methoden</b> . . . . .	39
3.1.1	Bestimmung von Zellzahlen . . . . .	39
3.1.2	Kultivierung von L929 Zellen . . . . .	39
3.1.3	Herstellung von infizierten und nicht infizierten L929 Inokulaten . .	39
3.1.4	Immunfluoreszenz zum Nachweis von <i>O. tsutsugamushi</i> . . . . .	40
3.1.5	<i>Immunofocus</i> -Assay zur Quantifizierung von infizierten Inokulaten .	40
3.1.6	Präparation von murinen Lymphozyten aus der Milz . . . . .	41
3.1.7	Präparation von murinen Lymphozyten aus der Lunge . . . . .	41
3.1.8	Restimulation von murinen Zellen <i>in vitro</i> . . . . .	42
3.1.9	Durchflusszytometrische Analyse . . . . .	42
3.1.10	Bead-basierender Immunassay zur Quantifizierung von Zytokinen - LEGENDplex <sup>TM</sup> . . . . .	43
3.1.11	Herstellung von $\alpha$ -CTLA-4 (Klon 4F10) für <i>in vivo</i> Applikationen .	44
3.2	<b>Molekularbiologische Methoden</b> . . . . .	45
3.2.1	DNA-Aufreinigung von Organproben . . . . .	45
3.2.2	Bestimmung von DNA-Konzentrationen . . . . .	45
3.2.3	Quantitative <i>Realtime</i> -PCR (qPCR) . . . . .	46
3.3	<b>Tierexperimentelle Methoden</b> . . . . .	46
3.3.1	Infektion mit <i>Orientia tsutsugamushi</i> und Injektion von L929 Kon-trollzellen . . . . .	46
3.3.2	Injektion von Antikörpern . . . . .	47
3.3.3	Präparation von Organen . . . . .	47
3.3.4	Ethik . . . . .	47
3.4	<b>Statistik</b> . . . . .	48
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
4.1	<b>T-Zell-Antwort einer <i>Orientia tsutsugamushi</i> Infektion in der C57- BL/6 Maus</b> . . . . .	49
4.1.1	Reduzierter Gesundheitszustand nach der <i>O. tsutsugamushi</i> Infektion	49
4.1.2	Organotropismus von <i>Orientia tsutsugamushi</i> . . . . .	50
4.1.3	Invasion der T-Lymphozyten in die Lunge während der akuten Pha-se der Infektion . . . . .	52
4.1.4	Aktivierung der CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten nach Infektion . . . . .	54

4.1.5	Abnahme der CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Tregs) nach der Infektion . . . . .	56
4.1.6	T-Zellen zeigen eine gesteigerte Expression der negativen Regulatoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 nach der Infektion . . . . .	58
4.2	<b>Einfluss der negativen Korezeptoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 auf die Infektion mit <i>Orientia tsutsugamushi</i></b> . . . . .	62
4.2.1	Blockade von CTLA-4 während der akuten und chronischen Phase der Infektion im Vergleich . . . . .	63
4.2.1.1	Eine frühe Blockade von CTLA-4 verstärkt die Symptomatik während der Infektion . . . . .	65
4.2.1.2	Invasion von CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten bei gleichzeitigem CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Abfall nach früher CTLA-4 Blockade . . . . .	66
4.2.1.3	Frühe Blockade von CTLA-4 führt zu einer überwiegend reduzierten CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung . . . . .	68
4.2.1.4	Höhere Bakterienlast in der Lunge nach einer Blockade von CTLA-4 . . . . .	70
4.2.2	Blockade von PD-1 während der akuten und chronischen Phase der Infektion im Vergleich . . . . .	72
4.2.2.1	Unveränderte Symptomatik nach früher PD-1 Blockade . . . . .	73
4.2.2.2	Unveränderte Anzahl von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T Lymphozyten nach PD-1 Blockade . . . . .	73
4.2.2.3	PD-1 Blockade steigert die Produktion von den Zytokinen IFN $\gamma$ und IL-2 in der chronischen Phase der Infektion . . . . .	74
4.2.2.4	Erhöhte Bakterienlast in der Lunge nach später PD-1 Blockade . . . . .	76
4.2.3	Kombinierte Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 während der akuten und chronischen Phase der Infektion im Vergleich . . . . .	77
4.2.3.1	Unveränderte Symptomatik nach kombinierter Blockade . . . . .	79
4.2.3.2	Unveränderte Anzahl an CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach kombinierter Blockade . . . . .	80
4.2.3.3	Frühe und späte kombinierte Blockade steigert die IFN $\gamma$ -Produktion auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen, nicht aber die Produktion von IL-2 . . . . .	81
4.2.3.4	Unveränderte Bakterienlast in der Lunge nach früher und später kombinierter Blockade . . . . .	83
4.2.4	Gegenüberstellung der Ergebnisse der verschiedenen Blockadeexperimente . . . . .	84
4.3	<b>Eine gesteigerte Bakterienlast korreliert während einer <i>Orientia tsutsugamushi</i> Infektion mit einer erhöhten IL-10-Produktion</b> . . . . .	84
4.3.1	Eine frühe Blockade von CTLA-4 induziert eine erhöhte IL-10-Produktion in <i>in vitro</i> restimulierten Milzzellen . . . . .	85
4.3.2	Gesteigerte IL-10-Produktion der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge nach später PD-1 Blockade . . . . .	86

4.3.3	Unveränderte IL-10-Produktion nach einer kombinierten Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 . . . . .	88
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
5.1	Organspezifische Dynamik der T-Zell-Aktivierung . . . . .	90
5.2	CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 - Kompensation der fehlenden Tregs während der <i>Orientia tsutsugamushi</i> Infektion . . . . .	94
5.3	CTLA-4 - Sicherung der Homöostase von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten während der <i>Orientia tsutsugamushi</i> Infektion . . .	97
5.4	IL-10 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> koproduzierende Zellen als Auslöser der erhöhten Bakterienlast . . . . .	99
5.5	Modell zur CTLA-4 Blockade während einer <i>Orientia tsutsugamushi</i> Infektion . . . . .	101
5.6	Modell zur PD-1 Blockade während einer <i>Orientia tsutsugamushi</i> Infektion . . . . .	103

Danksagung

# Abbildungsverzeichnis

1.1	<i>Budding</i> -Prozess . . . . .	2
1.2	Replikationszyklus von <i>O. tsutsugamushi</i> . . . . .	3
1.3	Lebenszyklus einer Milbe der Gattung <i>Leptotrombidium</i> und Übertragung von <i>O. tsutsugamushi</i> . . . . .	4
1.4	Verbreitungsgebiet des Tsutsugamushi-Fiebers . . . . .	5
1.5	Die T-Zell-Aktivierung . . . . .	10
1.6	Intrazellulärer Transport von CTLA-4 . . . . .	17
1.7	Signalweg von CTLA-4 . . . . .	19
1.8	Signalweg von PD-1 . . . . .	22
1.9	Signalweg von TIM-3 . . . . .	24
3.1	Extra- und intrazelluläre Färbeschema für Durchflusszytometrie . . . . .	43
4.1	Gewichtsveränderungen in <i>O. tsutsugamushi</i> infizierten C57BL/6 Mäusen . . . . .	50
4.2	Bakterienlast in verschiedenen Organen im Verlauf einer <i>O. tsutsugamushi</i> Infektion . . . . .	51
4.3	Verlauf der CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge von <i>O. tsutsugamushi</i> infizierten C57BL/6 Mäusen . . . . .	53
4.4	Aktivierungsmarker auf CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten bei <i>O. tsutsugamushi</i> infizierten C57BL/6 Mäusen . . . . .	55
4.5	Abnahme regulatorischer T-Zellen in Milz und Lunge während der Infektion mit <i>O. tsutsugamushi</i> . . . . .	57
4.6	Expression negativer Korezeptoren auf pulmonalen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen während der Infektion mit <i>O. tsutsugamushi</i> . . . . .	59
4.7	Expression negativer Korezeptoren auf pulmonalen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen während der Infektion mit <i>O. tsutsugamushi</i> . . . . .	61
4.8	Versuchsablauf der CTLA-4 Blockade in der akuten sowie in der chronischen Phase der Infektion . . . . .	64
4.9	Mausgewicht nach früher und später Blockade von CTLA-4 . . . . .	65
4.10	CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge nach früher und später CTLA-4 Blockade . . . . .	67
4.11	Aktivierungsmarker auf CD8 <sup>+</sup> Lungenzellen nach Blockade von CTLA-4 . . . . .	69
4.12	Bakterienlast in der Lunge nach früher und später CTLA-4 Blockade . . . . .	71
4.13	Versuchsablauf der PD-1 Blockade in der akuten sowie in der chronischen Phase der Infektion . . . . .	72
4.14	Mausgewicht nach früher und später Blockade von PD-1 . . . . .	73



---

4.15	CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge nach früher und später PD-1 Blockade . . . . .	74
4.16	Intrazelluläre Zytokinexpression von IL-2 und IFN $\gamma$ in pulmonalen CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen nach früher und später PD-1 Blockade . . . . .	75
4.17	Bakterienlast in der Lunge nach früher und später PD-1 Blockade . . . . .	77
4.18	Versuchsablauf der frühen und späten kombinierten Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 . . . . .	78
4.19	Mausgewicht nach früher und später kombinierter Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 . . . . .	79
4.20	CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge nach früher und später kombinierter Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 . . . . .	80
4.21	IFN $\gamma$ - und IL-2 Zytokinexpression von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> Lungenzellen nach früher und später kombinierter Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 . . . . .	82
4.22	Bakterienlast in der Lunge nach früher und später kombinierter Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 . . . . .	83
4.23	Ergebnisgegenüberstellung der verschiedenen Blockadeexperimente . . . . .	84
4.24	IL-10-Produktion von restimulierten Milzzellen nach akuter Blockade von CTLA-4 . . . . .	86
4.25	IL-10-Produktion von CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten von <i>O. tsutsugamushi</i> infizierten C57BL/6 Mäusen nach früher und später PD-1 Blockade . . . . .	87
4.26	IL-10-Zytokinexpression von CD4 <sup>+</sup> Lungenzellen nach früher und später kombinierter Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 . . . . .	89
5.1	Modell zur CTLA-4 Blockade . . . . .	101
5.2	Modell zur PD-1 Blockade . . . . .	103

# Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Laborgeräte . . . . .	30
2.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien . . . . .	31
2.3	Chemikalien und Reagenzien für zellbiologische Methoden . . . . .	32
2.4	Chemikalien und Reagenzien für molekularbiologische Methoden . . . . .	33
2.5	Antikörper für durchflusszytometrische Analysen . . . . .	33
2.6	Antikörper für <i>in vitro</i> Analysen . . . . .	34
2.7	Antikörper für <i>in vivo</i> Behandlungen . . . . .	34
2.8	Antikörper für Immunfluoreszenz . . . . .	34
2.9	Zelllinien . . . . .	34
2.10	Hybridom . . . . .	35
2.11	Bakterienstamm . . . . .	35
2.12	Mausstamm . . . . .	35
2.13	Kulturmedien, Puffer, Stammlösungen für zellbiologische und tierexperi- mentelle Arbeiten . . . . .	36
2.14	Kulturmedien, Puffer, Stammlösungen für molekularbiologische Arbeiten .	37
2.15	Oligonukleotide . . . . .	38
2.16	Software . . . . .	38
3.1	Reaktionsansatz für die <i>traD</i> qPCR . . . . .	46

# Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
$\alpha$ -	Anti-
<i>O.tsu</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
<i>Aq. bidest.</i>	Zweifach destilliertes Wasser
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>O. tsutsugamushi</i>	<i>Orientia tsutsugamushi</i>
°C	Grad Celsius
$\mu$ M	Mikromolar
$\mu$ m	Mikrometer
Ag	Antigen
AP2	Clathrin Adaptor Komplex
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ARF-1	engl. <i>ADP-ribosylation factor 1</i>
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
BSA	Bovines Serumalbumin
BSL3	engl. <i>Biosafety level 3</i>
BV510	Brilliant Violet 510
BZR	B-Zell-Rezeptor
cAMP	engl. <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CD3	T-Zell Rezeptor-Signaltransduktionskomplex
CD62L	Zell-Adhäsionsmolekül L-Selektin
chron.	Chronische
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CTLA-4	engl. <i>Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4</i>
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP-Mix	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELC	engl. <i>EBV-induced molecule 1 ligand chemokine</i>
engl.	englisch
ERK	engl. <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	engl. <i>Fluorescent activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FMO	engl. <i>Fluorescent minus one</i>
Foxp3	engl. <i>Forkhead box p3</i>
g	Gramm
GlyCAM-1	engl. <i>glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i>

GM-CSF	engl. <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GrzB	Granzym B
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
ICAM	engl. <i>Intercellular adhesion molecule</i>
id.	Intradermal
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-12R	Interleukin 12 Rezeptor
IL-13	Interleukin 13
IL-17	Interleukin 17
IL-2	Interleukin 2
IL-2R	Interleukin 2 Rezeptor
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-9	Interleukin 9
ip.	Intraperitoneal
ITIM	engl. <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
iTregs	Induzierbare regulatorische T-Zellen
IVC	engl. <i>Individually ventilated cages</i>
JNK	engl. <i>Jun N-terminal kinase</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KLRG1	engl. <i>Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i>
L	Liter
LAG-3	engl. <i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
LCMV	engl. <i>Lymphocytic Choriomeningitis Virus</i>
LFA-1	engl. <i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LN	Poplitealer Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MAP	engl. <i>Mitogen-activated protein</i>
mg	Milligramm
MHC	engl. <i>Major histocompatibility complex</i>
MHC-I	MHC-Klasse I
MHC-II	MHC-Klasse II
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid

NADPH	Nicotinaminadeninindinukleotidphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NF-AT	engl. <i>Nuclear factor of activated T cells</i>
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NK	Natürliche Killer Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
ns	Nicht Signifikant
nTregs	Natürliche regulatorische T-Zellen
p.i.	Post infection
PAMP	Pathogenassoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	engl. <i>Programmed death 1</i>
PD-L1/2	engl. <i>Programmed death ligand 1/2</i>
PFHM	engl. <i>Protein-free hybridoma medium</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PP2A	Serin/Threonin Protein Phosphatase 2A
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
ROS	engl. <i>Reactive oxigen species</i>
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sc.	Subkutan
SEM	engl. <i>Standard error of the mean</i>
sfu	engl. <i>Spot forming units</i>
SHP	SH2 enthaltene Tyrosin Phosphatase
SLC	engl. <i>secondary lymphoid-tissue chemokine</i>
SMAD4	engl. SMAD Family Member 4
T <sub>EM</sub>	Effektor-Memory T-Zellen
T <sub>H</sub> 1(2,3,9,17)	T-Helfer Zellen 1 (2,3,9,17)
T <sub>R</sub> 1 Zellen	Regulatorischer T-Zell Typ 1
T <sub>ZM</sub>	Zentrale Memory T-Zellen
TBS	engl. <i>Tris-buffered Saline</i>
TEM	Effektor Memory T-Zellen
TGFβ	engl. <i>Transforming growth factor-β</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Trisaminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
U/mg	Unit pro Milligramm
x g	Erdbeschleunigung
ZTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt

## Zusammenfassung

*Orientia tsutsugamushi* (*O. tsutsugamushi*) ist ein humanpathogenes intrazelluläres Bakterium, das über Milbenlarven im südostasiatischen Raum übertragen wird und als Auslöser des Tsutsugamushi-Fiebers gilt. Dieses führt, abhängig von dem Bakterienstamm, in bis zu 70 % zum Tod. Bei der Abwehr von *O. tsutsugamushi* spielt eine massiv aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort eine große Rolle, die - wie aus anderen Infektionen bekannt - jedoch negativ reguliert werden muss, um immunpathologische Phänomene zu verhindern. In dieser Arbeit wurde erstmals die Rolle der koinhibitorischen Rezeptoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort während einer murinen *O. tsutsugamushi* Infektion untersucht. Während der experimentellen *O. tsutsugamushi* Infektion wurden die untersuchten koinhibitorischen Rezeptoren während der akuten Phase der Infektion vermehrt auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert. CTLA-4 war dabei auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen quantitativ am stärksten vertreten. Bei diesen CTLA-4 produzierenden Zellen handelt es sich jedoch nicht um klassische Foxp3<sup>+</sup> Regulatorische T-Zellen, da gezeigt werden konnte, dass diese während der *O. tsutsugamushi* Infektion abnehmen. Auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen war TIM-3 der am stärksten vertretene negative Regulator. Während die anderen Regulatoren in der chronischen Phase wieder abnahmen, zeigte PD-1 ein zusätzliches Maximum in der chronischen Phase. Anders als aufgrund der Beobachtungen in anderen Infektionsmodellen zu erwarten, führte eine *in vivo* Blockade von CTLA-4 während der akuten Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion zu einer massiven Steigerung des CD4<sup>+</sup> und einer gleichzeitigen Abnahme des CD8<sup>+</sup> T-Zell-Anteils, der zudem einen verminderten aktivierten Phänotyp durch eine reduzierte Expression von KLRG1, CD11a und CD44 aufzeigte. Zudem bedingte die Blockade von CTLA-4 einen Anstieg der Bakterienlast in der Lunge. Auch eine späte Blockade von PD-1 führte zu einer gesteigerten Bakterienlast in der Lunge, verbunden mit einer gesteigerten Zytokinproduktion von IL-2 und IFN $\gamma$  durch T-Zellen. Eine kombinierte Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 hatte keinen Einfluss auf die T-Effektorantwort sowie die Bakterienlast in der Lunge. Interessanterweise konnte im Zusammenhang mit der erhöhten Bakterienlast nach der frühen CTLA-4 bzw. der späten PD-1 Blockade eine erhöhte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gezeigt werden, die bei der unveränderten Bakterienlast nach der kombinierten Blockade nicht nachzuweisen war. Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass CTLA-4 und PD-1 während der *O. tsutsugamushi* Infektion nicht hauptsächlich die Effektorantwort inhibieren, sondern einen inhibitorischen Einfluss auf die regulatorischen Mechanismen der T-Zell-Antwort zu haben scheinen, wobei es sich um einen bislang nicht beschriebenen Effekt handelt. Dieser hat zur Folge, dass sich die Effektorantwort und der Verlauf der antibakteriellen Abwehr durch die Blockade der negativen Kostimulation nicht verbessert, sondern - zumindest temporär - verschlechtert.

## Summary

*Orientia tsutsugamushi* (*O. tsutsugamushi*) is a human pathogenic obligatory intracellular bacterium that is transmitted via mite larvae mainly in southeast asia and is said to be responsible for the febrile disease, named scrub typhus. Untreated scrub typhus leads to death in up to 70 % of cases, depending on the *O. tsutsugamushi* strain. To control *O. tsutsugamushi* a strong activated CD8<sup>+</sup> T cell response is necessary. But, related to other infection models, the T cell response has also be negatively regulated to prevent immunopathological effects. So far little is known about the coinhibition during an infection with *O. tsutsugamushi*. During this thesis the role of the costimulatory receptors CTLA-4, PD-1, TIM-3 and LAG-3 during the T cell mediated immune response was analyzed during a murine infection with *O. tsutsugamushi* for the first time. After an infection with *O. tsutsugamushi* the analyzed coinhibitory molecules were increased on CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells during the acute phase of the disease. Thereby CTLA-4 was the most prominent marker on CD4<sup>+</sup> T cells. Due to the decrease of CTLA-4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs during the infection with *O. tsutsugamushi* this CTLA-4 expressing cells are no classical Tregs. On CD8<sup>+</sup> T cells TIM-3 was the most prominent coinhibitor. While a decrease of the other coinhibitory receptors during the chronic phase could be observed, PD-1 showed a two-phase expression with an additional peak during the chronic phase of the disease. In other infection models a blockade of coinhibitory receptors led to an increased T cell immune response and a reduced pathogen burden. However an *in vivo* blockade of CTLA-4 during the acute phase of the *O. tsutsugamushi* infection caused an increase of CD4<sup>+</sup> and a decrease of CD8<sup>+</sup> T cells, that showed moreover a less activated phenotype with a decreased expression of KLRG1, CD11a and CD44. In addition there was an increased bacteria load observed in the lung. Also a blockade of PD-1 during the chronic phase of the disease led to an increased bacteria load in the lung associated with an increased cytokine production of IL-2 and IFN $\gamma$  by T cells. A combined blockade of PD-1, TIM-3 and LAG-3 didn't have an influence on the T effector response or the bacteria load. Interestingly, there was a correlation of the bacteria load after the early CTLA-4 and the late PD-1 blockade with the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10, which wasn't seen after a combined blockade.

The data show that CTLA-4 and PD-1 are not the main inhibitors of the T effector response, but may have an inhibitory effect on coinhibitory mechanisms. This doesn't result in an improvement of the effector response and the bacterial clearance after a blockade of the coinhibitors, but - at least temporary- in an impairment.

# 1 Einleitung

## 1.1 *Orientia tsutsugamushi*

*Orientia tsutsugamushi* (*O. tsutsugamushi*; japanisch: tsutsuga = klein und gefährlich; mushi = Lebewesen) ist ein intrazelluläres humanpathogenes Bakterium aus der Familie der Rickettsiaceae, das vor allem im südostasiatischen Raum verbreitet ist [1]. Es gilt als Auslöser des Tsutsugamushi-Fiebers, einer bisher zwar mittels Antibiotika behandelbaren, jedoch eine Bakterienpersistenz aufweisende tropische Erkrankung, bei der die Inzidenz auf etwa eine Millionen Fälle pro Jahr geschätzt wird [2–4]. Aufgrund der unspezifischen Symptomatik der Infektion bleiben jedoch viele Fälle undiagnostiziert [2]. Im Mittel verlaufen etwa 6 % der Infektionen tödlich, wobei jedoch je nach *O. tsutsugamushi* Stamm die Mortalität zwischen 0-70 % schwankt [2].

### 1.1.1 Taxonomie und Morphologie

*O. tsutsugamushi* wurde 1920 erstmals von dem Japaner Naosuke Hayashi entdeckt und wurde zunächst unter dem Namen *Theileria tsutsugamushi* bekannt [5]. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Erreger jedoch noch nicht als Bakterium identifiziert. 1930 wurde sogar von einem Virus ausgegangen, der von Nagayo *et al.* der Gattung der *Rickettsia* zugeordnet wurde und zu einer Namensänderung in *Rickettsia orientalis* führte [6]. Um jedoch beiden Entdeckern gerecht zu werden, wurde der Erreger schon ein Jahr später in *Rickettsia tsutsugamushi* umbenannt [7]. Erst 1995 wurde aufgrund diverser Unterschiede zu den *Rickettsia* die eigene Gattung *Orientia* eingeführt, so dass das Bakterium seinen heutigen Namen *Orientia tsutsugamushi* erhielt [8]. *Orientia tsutsugamushi* unterscheidet sich zu den *Rickettsia* zum Beispiel durch das Fehlen der Zellwandbestandteile Peptidoglykan und Lipopolysacchariden (LPS) [8, 9] sowie durch Sequenzunterschiede der 16S rRNA [8]. Mohammed Gharaibeh konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass es durch das Fehlen des LPS keine Liganden für den Toll-like Rezeptor 4 gibt [10].

Innerhalb der Art *O. tsutsugamushi* wird des Weiteren zwischen verschiedenen Stämmen unterschieden. Bisher bekannt sind neben den drei Hauptstämmen Gilliam, Kato und dem in dieser Arbeit verwendeten Karp Stamm, mehr als 30 weitere ausgeprägte Serotypen [11], wobei neuere Studien von Nakayama *et al.* aufgrund der gestiegenen Zahl an Isolaten von weitaus mehr Stämmen ausgehen [12]. Des Weiteren spielt die hohe Rekombinationsrate von *O. tsutsugamushi* bei der Evolutionsgenetik und somit bei der Mannigfaltigkeit des Bakteriums eine wichtige Rolle [13].

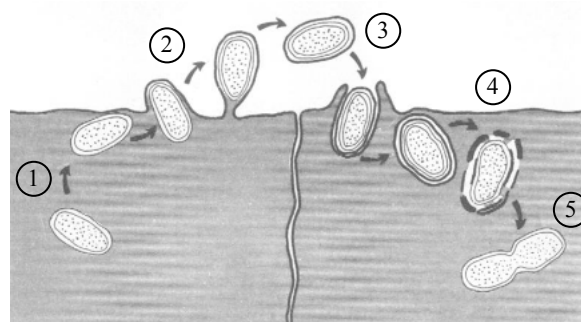
*O. tsutsugamushi* ist ein intrazelluläres, gram-negatives Bakterium einer kokkoiden Form mit einer Breite von 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 1,2-3  $\mu\text{m}$  [14]. Seine Lebensweise, sein



Replikationszyklus und seine klinische Relevanz werden in den nachfolgenden Kapiteln näher beschrieben.

### 1.1.2 Lebensweise von *Orientia tsutsugamushi*

In seinen Wirten, die kleine Nagetiere, Vögel und Menschen darstellen können, lebt *O. tsutsugamushi* überwiegend im Zytoplasma der Zellen, der Ort, an dem auch üblicherweise die Vermehrung des Bakteriums stattfindet [15, 16]. In Ausnahmefällen konnte auch eine Vervielfältigung im Zellkern beobachtet werden [17]. Im Rahmen der Vermehrung durchlebt *O. tsutsugamushi* einen speziellen Replikationszyklus, der einen *budding* Prozess beinhaltet und in den Abbildungen 1.1 und 1.2 schematisch dargestellt ist [15, 18].

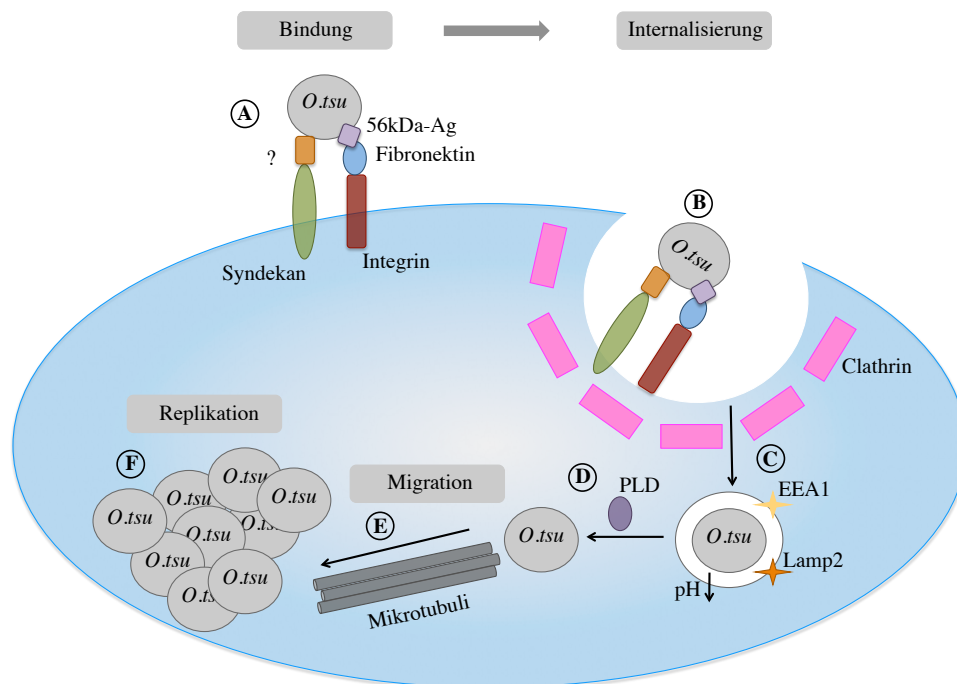


**Abbildung 1.1: Replikationszyklus von *O. tsutsugamushi* inklusive *budding*-Prozess.**

*O. tsutsugamushi* wandert zur Oberfläche der Wirtszelle (1). Dort spaltet sich das Bakterium von der Zelloberfläche ab und erhält eine zusätzliche Membran (*budding*; 2). Eine Zielzelle phagozytiert die Orientien (3), woraufhin sie die bei der Phagozytose entstandene Vakuole wieder verlassen (4). Die Bakterien liegen frei im Zytoplasma vor und vermehren sich durch binäre Teilung (5). Verändert nach [15].

Ein vollständiger Replikationszyklus dauert etwa 9 h und beginnt mit einer Wanderung der Bakterien zur Oberfläche der Wirtszelle (1) [4]. Dort erhalten sie eine zusätzliche Membran, indem sie sich von der Zelloberfläche abspalten (2; engl. *budding*). Welche Rolle dieser dritten Membran zukommt und welche Stabilität diese besitzt ist bisher noch nicht bekannt. Die Orientien werden daraufhin von einer neuen, zu diesem Zeitpunkt noch nicht infizierten Zelle, phagozytiert (3; Details siehe Abbildung 1.2). Die Bakterien verlassen im Anschluss die durch die Phagozytose entstandene Vakuole (4) und liegen wieder frei im Zytoplasma vor, so dass die eigentliche Vervielfältigung durch eine binäre Teilung stattfinden kann (5) [15].

Inzwischen sind weitere Details des Replikationszyklus bezogen auf die Internalisierung des Bakteriums bekannt. Diese sind in Abbildung 1.2 dargestellt.



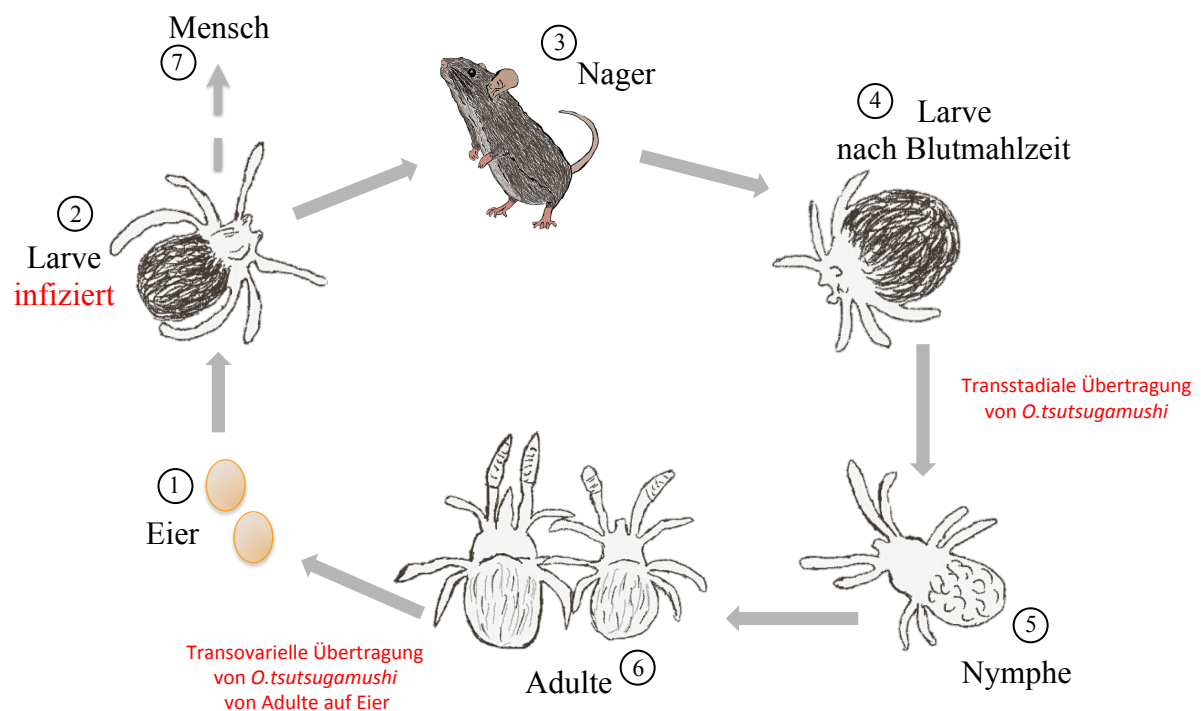
**Abbildung 1.2: Replikationszyklus von *O. tsutsugamushi*.**

(A) *O. tsutsugamushi* besitzt ein spezifisches 56 kDa Antigen (56kDa-Ag) auf seiner Oberfläche, das an Fibronectin, einem extrazellulären Matrixprotein der Wirtszelle, bindet und so eine Interaktion mit dem wirtsspezifischen Rezeptor Integrin ermöglicht. Durch die Interaktion zwischen *O. tsutsugamushi* und der Wirtszelle werden Signalmoleküle aktiviert, die die Internalisierung des Bakteriums in die Zelle durch einen Clathrin-vermittelten Signalweg ermöglichen (B). (C) *O. tsutsugamushi* kolokalisiert kurz nach der Invasion mit den endosomalen Markern EEA1 und LAMP2. Unter der Beteiligung der Phospholipase D (PLD) wird das Bakterium aus dem Phagosom entlassen (D). Es folgt eine Migration des Bakteriums entlang von Mikrotubuli (E), um eine Replikation in der Nähe des Zellkerns zu ermöglichen (F). In Anlehnung an [18, 19].

Nachdem *O. tsutsugamushi* sich von einer Zelle abgespalten hat (siehe Abbildung 1.1; 2), bindet das Bakterium (A) mit Hilfe von seinem spezifischen 56 kDa Antigen (56kDa-Ag) auf seiner Oberfläche [19] an Fibronectin, einem extrazellulären Matrixprotein der Wirtszelle [19, 20]. Die Bindung an Fibronectin ermöglicht eine Interaktion mit dem wirtsspezifischen Rezeptor Integrin [18] wodurch es zu einer Aktivierung von Signalmolekülen, wie etwa einer Adhäsionskinase und Src Kinase [21] kommt, die die Internalisierung (B) des Bakteriums durch die Wirtszelle mittels eines Clathrin-vermittelten Signalweges ermöglicht [18, 22]. Welche Moleküle an der Bindung von dem wirtsspezifischen Rezeptor Syndekan beteiligt sind, ist noch nicht bekannt [23]. Daraufhin kolokalisiert *O. tsutsugamushi* mit den endosomalen Markern EEA1 und Lamp2 [22] (C). Der Mechanismus, mit dem das Bakterium das Phagosom wieder verlässt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass eine Beteiligung der Phospholipase D (PLD) für die Zerstörung des Phagosoms sorgt und somit die Freilassung des Bakteriums bewirkt (D) [24, 25]. Auch eine Ansäuerung des Phagosoms könnte an der Freisetzung des Bakteriums beteiligt sein [18]. Nach der Freilassung von *O. tsutsugamushi* in das Zytoplasma wandert es entlang der Mikrotubuli (E) bis zum Mikrotubuli-Organisations-Zentrum [26]. In der Nähe des Zellkerns erfolgt daraufhin die Replikation von *O. tsutsugamushi* durch binäre Teilung (F) [15]. Anschließend wird das Bakterium aus der Wirtszelle entlassen (siehe Abbildung 1.1; 1 und 2). Der Replikationszyklus kann nun erneut beginnen, um so die Ausbreitung von *O. tsutsugamushi* auf weitere Wirtszellen zu gewährleisten.

Im Menschen konnten vor allem Dendritische Zellen (DZ), Monozyten und Makrophagen der Milz, Leber, Herz und Lunge als Wirtszellen nachgewiesen werden [27]. Aber auch in Endothelzellen aller Organe und vieler Blutgefäße ist *O. tsutsugamushi post mortem* nach einer Infektion im Menschen zu finden [27]. In der Maus hingegen hängt es von der gewählten Infektionsroute ab, ob die Bakterien auch in den Endothelzellen nachgewiesen werden können. So konnten die Bakterien in den Endothelzellen der Maus bisher lediglich nach einer intravenösen Infektion gezeigt werden [28]. Nach einer subkutanen (sc.) Infektion der Maus befinden sich die Bakterien vorwiegend in den Kupffer Zellen und Makrophagen der Leber sowie in Milz, Lunge, Niere, Herz, Gehirn, Lymphknoten, Thymus und in den Nebennieren [27, 29, 30].

In der Natur erfolgt die Verbreitung von *O. tsutsugamushi* zwischen den Wirten über Milben der Gattung *Leptotrombidium* als Hauptvektor (siehe Abbildung 1.3) [31]. Allerdings konnte auch von Fällen berichtet werden, bei denen Milben anderer Gattungen (z.B. *Blaukaartia* sp. und *Ascoschoengastia* sp.) für die Übertragung verantwortlich gemacht wurden [32].



**Abbildung 1.3: Lebenszyklus einer Milbe der Gattung *Leptotrombidium* und Übertragung von *O. tsutsugamushi*.** Milben durchlaufen einen Lebenszyklus von einem Ei (1) über ein Larven- (2; 4) und Nymphenstadium (5) bis hin zu einem adulten Tier (6). Die Larven ernähren sich vom Blut bzw. Gewebsflüssigkeit kleiner Nagetiere (3). Die Übertragung von *O. tsutsugamushi* erfolgt durch den Biss einer infizierten Milbe, wobei der Mensch ein Fehlwirt sein kann (7). Adulte Tiere übertragen *O. tsutsugamushi* transovariell auf ihre Eier sowie transstadial im Verlauf ihres Lebenszyklus. In Anlehnung an [31].

Milben leben überwiegend in Gräsern und Unterholz und durchlaufen einen Lebenszyklus von einem Ei (1) über ein Larven- (2; 4) und Nymphenstadium (5) bis hin zu einem adulten Tier (6) [1, 33]. Während die Nymphen und Adulten frei am Boden zu finden sind, ernähren sich ausschließlich die Larven vom Blut kleiner Nagetiere und Vögel, die am Boden auf Nahrungssuche sind [31]. Die Übertragung von *O. tsutsugamushi* erfolgt dabei durch einen Biss einer infizierten Milbenlarve [16]. Neuere Studien von Valbuena

*et al.* gehen jedoch nicht von einer Blutmahlzeit, sondern von einer Gewebemahlzeit aus. Die Milben durchbohren dabei die Epidermis mit ihren Cheliceren und formen eine Art Röhre, durch die sie Hautzellen, Gewebsflüssigkeit und Lymphe aufnehmen können [34]. *O. tsutsugamushi* wird transovariell von Adulten auf die Eier und somit auf die Milben übertragen. Des Weiteren wird das Bakterium transstadial im Verlauf des Lebenszyklus der Milbe übertragen. Menschen (7), die sich in der Nähe der Milben aufhalten, können ebenfalls von diesen gebissen und somit mit *O. tsutsugamushi* infiziert werden. Auch wenn sie lediglich als Fehlwirte gelten, sind immerhin jährlich eine Milliarde Menschen dem Risiko einer Infektion und somit einer Erkrankung am Tsutsugamushi-Fieber ausgesetzt [31, 35]. Eine Infektion von Mensch zu Mensch ist zwar selten, konnte jedoch bereits in Folge einer Stammzellspende nachgewiesen werden [36]. Auch bei Bluttransfusionen besteht die Gefahr einer Infektion, da die Bakterien bis zu zehn Tage bei 4 °C und bis zu 45 Tage bei -70 °C überstehen können [37].

### 1.1.3 Tsutsugamushi-Fieber - Symptome, Therapie und Epidemiologie einer humanen Infektion

Das Tsutsugamushi-Fieber ist auch unter den Namen Japanisches Fleckfieber, Milbenfleckfieber oder Buschfleckfieber bekannt. Es kommt überwiegend in dem sogenannten „Tsutsugamushi-Dreieck“ vor, das im Norden von Japan bis zum östlichen Teil Russlands reicht und sich im Süden bis Nord-Australien ausstreckt. Westlich ist das Gebiet von Pakistan und Afghanistan begrenzt [38]. Somit gilt der gesamte südostasiatische Raum als Risikogebiet für eine Infektion mit *O. tsutsugamushi* (siehe Abbildung 1.4) [31].



**Abbildung 1.4: Verbreitungsgebiet des Tsutsugamushi-Fiebers.**

Die Karte zeigt das Verbreitungsgebiet des Tsutsugamushi-Fiebers (schwarz). Im Norden reicht das Gebiet von Japan bis zum östlichen Teil Russlands und streckt sich im Süden bis Nord-Australien aus. Westlich ist das Gebiet von Pakistan und Afghanistan begrenzt. Karte nach [31].

Inzwischen konnten vereinzelte Fälle einer *O. tsutsugamushi* Infektion jedoch auch außerhalb der beschriebenen Region in Chile, Afrika sowie Dubai nachgewiesen werden [39–41]. Nach einer Inkubationszeit von üblicherweise zehn bis zwölf Tagen treten nach einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* erste grippeähnliche Symptome, wie ein generelles Unwohlsein verbunden mit Fieber, Kopfschmerzen und in manchen Fällen auch Hautausschlag auf

[16, 38, 42]. In 60-100 % der Patienten bildet sich um die Bissstelle der Milbe eine nekrotische Stelle, die als Eschar bezeichnet wird [4, 42]. Es treten verschiedene Verlaufsformen der Krankheit von mild bis tödlich auf, die von der jeweiligen Region und dem dort verbreiteten *O. tsutsugamushi* Stamm abhängig sind [38, 43, 44]. In schweren Fällen kann es zur Ausbildung von Enzephalitis, Kardiomyopathie und interstitieller Pneumonie kommen [38]. Auch die Entwicklung einer Meningitis sowie einem multiplen Organversagen ist in schweren Fällen möglich [45]. Zudem kann ein Anschwellen der drainierenden Lymphknoten im Rahmen einer regionalen Lymphadenopathie sowie in 30 % der Patienten eine stark vergrößerte Milz und Leber beobachtet werden [38]. In der schweren Verlaufsform der Krankheit sind auch Komplikationen der Lunge häufig zu verzeichnen [38]. Je nach Region und *O. tsutsugamushi* Stamm enden unbehandelte Infektionen in bis zu 70 % aller Fälle tödlich [2]. Bisher ist noch kein Impfstoff gegen *O. tsutsugamushi* verfügbar. Es besteht lediglich die Möglichkeit zur Behandlung eines Tsutsugamushi-Fiebers mit Antibiotika. Dabei wird neben Chloramphenicol, Tetrazyklin, Azithromycin, Rifampicin und Levofloxacin das besonders wirksame Doxyzyklin eingesetzt [46]. Eine Behandlung mit  $\beta$ -Laktam Antibiotika ist nicht indiziert, da *O. tsutsugamushi* durch den fehlenden Zellwandbestandteil Peptidoglycan eine Resistenz gegenüber diesen Antibiotikaklasse aufweist. Anders als bei anderen Bakterien kann eine Infektion mit *O. tsutsugamushi* durch die Behandlung mit den oben aufgeführten Antibiotika jedoch nicht geheilt werden. Die natürliche Folge einer abgelaufenen Infektion mit *O. tsutsugamushi* ist die Persistenz des Erregers [47]. Aus klinischen Beobachtungen [48] und Tierversuchen [49] ist bekannt, dass die Persistenz auch nach klinisch erfolgreicher Antibiotika-Therapie auftritt. Eine Immunsupprimierung durch eine Behandlung mit Cyclophosphamid führte *in vivo* zu einer Reaktivierung der Infektion [49]. Auch bei dem beschriebenen Fall der Infektion mit *O. tsutsugamushi* durch eine Stammzelltransplantation führte zu einer Reaktivierung des Bakteriums im Stammzellempfänger durch den GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) [36].

Die einzige Möglichkeit, die Folgen einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* zu verhindern, ist die Expositionsprophylaxe bei Reisen in endemische Gebiete durch Vermeidung von Milbenlarvenbissen durch das Tragen von körperbedeckender Kleidung und Anwendung von Repellents [50]. Des Weiteren muss weiter intensiv geforscht werden, um neue Therapiemöglichkeiten gegen *O. tsutsugamushi* zu finden.

#### 1.1.4 Mausmodell

Zur Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten des Tsutsugamushi-Fiebers werden überwiegend Mäuse eingesetzt, da sich dort die natürliche Umgebung z.B. von Endothelzellen am besten untersuchen lässt [34]. Inzwischen hat sich die Forschung zu dem Thema *O. tsutsugamushi* so weiterentwickelt, dass auch spezielle an bestimmte Fragestellungen angepasste Mausmodelle eingesetzt werden können. So nutzten Ha *et al.* beispielsweise ein spezielles Autotransporterprotein von *O. tsutsugamushi* zur Immunisierung, um so eine protektive Immunität gegen das Tsutsugamushi-Fieber zu erlangen [51]. Inzwischen gibt es bereits Studien, bei denen *O. tsutsugamushi* direkt durch infizierte Milben auf Mäu-

se übertragen wird, um der natürlichen Infektionsroute näher zu kommen [52]. Jedoch bestehen damit bisher erst wenige Erfahrungen.

Mäuse eignen sich besonders gut zur Untersuchung der *O. tsutsugamushi* Infektion, da sie als kleine Nager nicht nur den natürlichen Wirt darstellen, sondern zudem eine Infektion in den Mäusen in vielen Punkten mit einer humanen Infektion vergleichbar ist [53]. So zeigen Mäuse ebenfalls an d10 - d15 nach der Infektion Krankheitssymptome [30]. Des Weiteren konnte auch im Mausmodell gezeigt werden, dass *O. tsutsugamushi* eine Persistenz aufweist. In diesem Zusammenhang konnten Fox *et al.* auch noch 610 Tage nach der Infektion mit *O. tsutsugamushi* lebende Bakterien in Blut, Leber, Gehirn und den Nieren nachweisen [54]. Die Schwere des Krankheitsverlaufes hängt dabei jedoch von dem *O. tsutsugamushi* Stamm ab. Während andere *O. tsutsugamushi* Stämme (z.B. Gilliam) eine sehr schwankende Virulenz aufweisen, konnten Groves *et al.* für den Karp Stamm eine, unabhängig vom gewählten Mausgenotyp, stets vergleichbare Infektiosität bezogen auf das Überleben der Mäuse nachweisen [55, 56]. Unterschiedliche Ausprägungen des Krankheitsverlaufes hängen jedoch häufig auch von dem genetischen Hintergrund des Wirtes ab [55]. Kekcheeva *et al.* konnte für C57BL/6 Mäuse die größte Resistenz gegenüber *O. tsutsugamushi* zeigen [57].

Neben der Wahl des Mausgenotypes und des *O. tsutsugamushi* Stammes ist auch die Infektionsroute im Mausmodell entscheidend. Während eine intraperitoneale (ip.) Infektion in vielen Fällen letal verläuft, kann eine subkutane/intradermale (sc./id.) Infektion von den Mäusen in der Regel besser überstanden werden [56]. Auch wenn keines der Mausmodelle alle pathogenen Effekte einer humanen Infektion vereint, entspricht eine Infektion in die Fußsohle der Maus, die eine sc. sowie eine id. Injektion vereint, am stärksten einer natürlichen dermalen Infektion nach einem Milbenbiss [30].

## 1.2 Effektormechanismen gegen intrazelluläre Erreger

Intrazelluläre Erreger lassen sich in Protozoen (z.B. *Leishmania spec.*), Viren (z.B. engl. *Lymphocytic Choriomeningitis Virus*; LCMV) und Bakterien unterteilen. Bakterien können einerseits intrazellulär in Vakuolen (z.B. *Mycobacteria sp.*, *Salmonella sp.* und *Chlamydia sp.*) vorkommen. Andererseits können Bakterien auch frei im Zytoplasma vorliegen, wie es zum Beispiel bei *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) sowie für alle Arten der *Rickettsiaceae* und somit auch für *O. tsutsugamushi* der Fall ist.

Bei Infektionen mit intrazellulären Erregern sind viele Gemeinsamkeiten in den Immunantworten zu beobachten. Im Rahmen der angeborenen Immunantwort phagozytieren zum Beispiel Makrophagen infizierte Zellen und schließen die Bakterien in Phagosomen ein. Die Makrophagen bilden nach ihrer Aktivierung die aus verschiedenen Untereinheiten bestehende NADPH-abhängige Oxidase, die sich in der Phagolysosomenmembran befindet [58–60]. Unter der Beteiligung der aktiven NADPH-abhängigen Oxidase wird molekularer Sauerstoff in Reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*; ROS) umgewandelt. Zunächst entstehen dabei aus dem molekularen Sauerstoff das Superoxidion ( $O_2^-$ ) sowie weitere Radikale [58, 60]. Daraufhin wandelt die Superoxiddismutase wiederum das

Superoxid in Wasserstoffperoxid um ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), das in der Lage ist, die sich im Phagolysosom befindenden Bakterien und andere Erreger abzutöten [58]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die NADPH-abhängige Oxidase nicht nur in Makrophagen, sondern auch in humanen Endothelzellen exprimiert werden kann [61]. Des Weiteren konnte eine Beteiligung der ROS nicht nur in den Phagolysosomen nachgewiesen werden, sondern von Feng *et al.* ebenso eine Rolle bei der Abwehr der Erreger im Zytosol zugewiesen werden [62]. Beim Abtöten der intrazellulären Erreger spielen jedoch nicht nur ROS eine Rolle. Auch Reaktive Stickstoffverbindungen (engl. *reactive nitrogen species*; RNS) wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) sind in den Makrophagen an der Bekämpfung der intrazellulären Erreger beteiligt [63]. Diese entstehen ebenfalls aus molekularem Sauerstoff, allerdings unter der Beteiligung des Enzyms NO-Synthase [64]. Um ihrer Aufgabe nachgehen zu können, müssen Makrophagen zunächst aktiviert werden. Dies erfolgt durch die Zytokine  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$ , die von T-Zellen, die zur adaptiven Immunantwort gehören, nach einer Antigenpräsentation sekretiert werden.

Neben der angeborenen Immunantwort spielt die adaptive Immunantwort mit seinen T- und B-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Bakterien, wobei im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf der T-Zell-Immunantwort liegt (siehe Kapitel 1.3).

### 1.3 Aktivierung und Regulation der T-Zell-Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien

T-Zellen haben ihren Ursprung im Knochenmark. Als Vorläuferzellen gelangen sie schließlich über das Blut in den Thymus, in dem sie dann zu immunkompetenten T-Zellen heranreifen [65]. Während des Reifungsprozesses findet die Bildung des spezifischen T-Zellrezeptors (TZR) durch Rekombination der TZR-Gene statt. Diese Genumlagerung der TZR-Gene ermöglicht die Bildung eines TZR-Repertoires, mit dem etwa  $10^{18}$  verschiedene Antigene erkannt werden können [58]. Im Thymus finden zudem positive und negative Selektionsprozesse statt [66, 67]. Im Rahmen der positiven Selektion sterben T-Zellen durch Apoptose, deren TZR weder MHC-Klasse I (engl. *major histocompatibility complex*) noch MHC-Klasse II Moleküle erkennen können, da diese T-Zellen keine Funktion besitzen. Bei diesem Selektionsprozess wird auch eine Entscheidung darüber getroffen, welchen Korezeptor die T-Zelle tragen wird. Zu diesen Korezeptoren zählen CD4 und CD8. Die T-Zellen, die während der positiven Selektion an MHC-I Moleküle binden, verlieren ihr CD4-Oberflächenmolekül und werden zu einfach positiven  $\text{CD8}^+$  T-Zellen. Umgekehrt verlieren die an MHC-II Moleküle bindende T-Zellen ihr CD8 und werden zu  $\text{CD4}^+$  T-Zellen [58, 65–67].  $\text{CD8}^+$  T-Zellen agieren während der Immunantwort als zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL), während die  $\text{CD4}^+$  T-Zellen als Helferzellen fungieren und entsprechend ihrer Aufgaben weiter in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden können ( $\text{T}_H1$ ,  $\text{T}_H2$ ,  $\text{T}_H9$ ,  $\text{T}_H17$ ; Details siehe Kapitel 1.3.1) [68–71]. In einem weiteren Selektionsschritt, der negativen Selektion, müssen autoreaktive T-Zellen durch

Apoptose sterben. Die reifen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen verlassen den Thymus über die Medulla und besiedeln die peripheren lymphatischen Organe als naive T-Zellen [58, 65]. Für die Bekämpfung von intrazellulären Bakterien konnte gezeigt werden, dass dabei die T-Zell-Immunantwort, verbunden mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen der T<sub>H</sub>1 Subpopulation, sowie CD8<sup>+</sup> ZTL, eine besonders wichtige Rolle spielt [72, 73]. Nagata und Koide zeigten in diesem Zusammenhang, dass vor allem die zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen die wichtigsten Effektorzellen gegen intrazelluläre, im Zytoplasma vorliegende Bakterien, sind [74]. Auch für eine Infektion mit *O. tsutsugamushi* konnte bereits nachgewiesen werden, dass T-Zellen während der Infektion eine entscheidende Rolle spielen [75]. Walker und Dummer beschrieben in diesem Zusammenhang vorläufige Daten, die auf die Bedeutsamkeit der CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei einer *O. tsutsugamushi* Infektion hinweisen. So beschrieben sie, dass bei einer *O. tsutsugamushi* Infektion 100 % von CD8<sup>+</sup> T-Zell-defizienten Mäusen starben, während die intravenöse Infektionsdosis so eingestellt wurde, dass lediglich 50 % der Wildtypmäuse überlebten ([76]; Guang und Walker, bisher unveröffentlichte Daten). Hauptmann *et al.* untersuchten ebenfalls die Rolle der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einer *O. tsutsugamushi* Infektion. Hier waren  $\beta_2M^{-/-}$  Mäuse, denen der funktionelle MHC-I Komplex und somit die Möglichkeit der positiven Selektion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus fehlen, unfähig *O. tsutsugamushi* zu bekämpfen (Hauptmann *et al.*, unveröffentlichte Daten). Untersuchungen der Zytokinproduktion von restimulierten Milz- und Lungenzellen während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* zeigten zudem eine starke Produktion von IFN $\gamma$  und eine im Vergleich sehr schwache Produktion von Interleukin-4 (IL-4) [77], was auf eine verstärkte T<sub>H</sub>1 Antwort hindeutet [78].

Um intrazelluläre Bakterien wie *O. tsutsugamushi* bekämpfen zu können, müssen naive T-Lymphozyten zunächst aktiviert werden. Dies erfolgt im peripheren lymphatischen Gewebe (Milz und Lymphknoten) und wird als *Priming* bezeichnet [65, 79].

### 1.3.1 T-Zell-Aktivierung

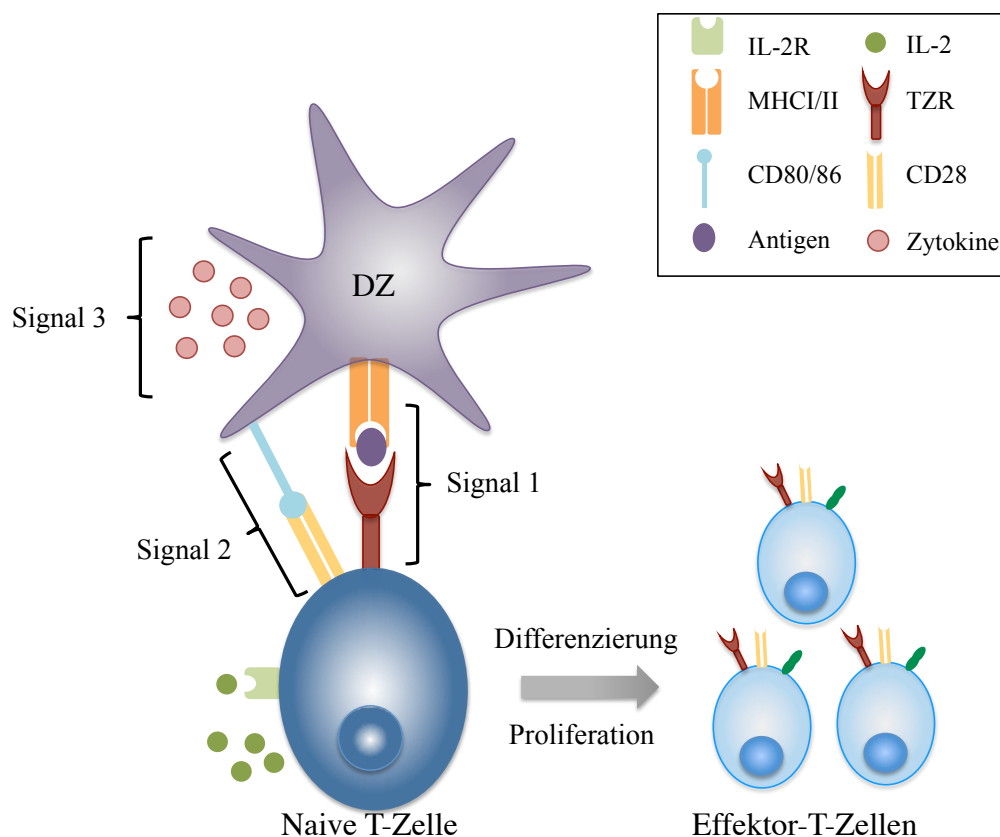
Bevor die Aktivierung der T-Zellen stattfinden kann, muss zunächst das intrazelluläre Bakterium als Pathogen erkannt werden. Diese Aufgabe übernehmen vor allem Dendritische Zellen (DZ), die zu den wichtigsten Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) gehören. Sie nehmen das Pathogen am Ort der Infektion durch Phagozytose auf und transportieren es über die afferenten Lymphgefäße in das nächstgelegene periphere lymphatische Gewebe, in der Regel den Lymphknoten. Chemokine, wie ELC (engl. *EBV-induced molecule 1 ligand chemokine*) und SLC (engl. *secondary lymphoid-tissue chemokine*), die an ihren Rezeptor CCR7 binden, rekrutieren die DZ zu der in den Lymphknoten lokalisierten T-Zell-Zone [80–82]. In diese gelangen über den Blutstrom gleichzeitig naive T-Zellen, die zuvor im Knochenmark gebildet und im Thymus gereift sind.

Um Antigene präsentieren zu können, müssen DZ diese zunächst in kleine Peptidfragmente zerkleinern, einem Vorgang, der als Antigenprozessierung bezeichnet wird. Man unterscheidet dabei zwischen zwei verschiedenen Wegen der Prozessierung. Einerseits können DZ Bakterien und Viren über phagozytotische Rezeptoren (z.B. Mannoserezeptor) erkennen. Die so erkannten Antigene durchlaufen einen endozytotischen Weg, indem sie pro-



zessiert werden und anschließend von MHC-II Molekülen den CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden können. Andererseits können Antigene direkt in das Zytosol der DZ eindringen und dort synthetisierte Proteine prozessieren, die dann wiederum an MHC-I Moleküle gebunden werden und an der Oberfläche den CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden [58, 83]. Peptide, die von den MHC-I Molekülen präsentiert werden, stammen demnach immer aus dem Zytosol und Peptide, die von den MHC-II Molekülen präsentiert werden stammen aus endozytotischen Vesikeln. MHC-I Moleküle präsentieren die Peptide dabei ausschließlich den CD8<sup>+</sup> T-Zellen, während MHC-II Moleküle für die Präsentation der Peptide an CD4<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich sind [58, 83].

Treffen nun naive T-Zellen mit einem für das Antigen spezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) auf die DZ mit ihrem MHC-Molekül-Peptid-Komplex, erhalten die T-Zellen ein erstes Signal (**Signal 1**), das zur Aktivierung der T-Lymphozyten benötigt wird (siehe Abbildung 1.5).



**Abbildung 1.5: Die T-Zell-Aktivierung.**

Für die vollständige Aktivierung naiver T-Zellen wird eine Kombination aus drei Signalen benötigt. Signal 1: Dem T-Zell-Rezeptor (TZR) wird das Antigen durch eine Dendritische Zelle (DZ) über den MHC-I/II Komplex präsentiert. Signal 2: Kostimulation durch die Bindung von CD28 auf der T-Zelle mit seinen Liganden CD80/86 auf der DZ. Die T-Zelle produziert daraufhin das Zytokin IL-2, das an seinen, durch Signal 1 und 2 hochregulierten, IL-2 Rezeptor (IL-2R) auf der T-Zelle bindet. Signal 3: DZ produzieren Zytokine (z.B. IL-6, IL-12 oder TGFβ), die zur Differenzierung der T-Zellen in die verschiedenen Subpopulationen von T-Effektorzellen führen. Signal 1-3 führen so zur Differenzierung der T-Zellen in aktivierte Effektor-T-Zellen und lösen deren Proliferation aus.

Dabei wird zwischen MHC-Klasse I (MHC-I) Molekülen, die an CD8<sup>+</sup> T-Zellen binden und MHC-Klasse II (MHC-II) Molekülen, die an CD4<sup>+</sup> T-Zellen binden, unterschieden. Zur vollständigen Aktivierung naiver T-Zellen sind diese jedoch auf ein weiteres Signal (**Signal 2**), das in Form einer Kostimulation auftritt, angewiesen. Dazu bindet CD28, das

von allen naiven T-Zellen auf der Oberfläche exprimiert wird, an seine Bindungspartner CD80/CD86 (B7.1/B7.2), die jedoch erst nach Aktivierung der DZ auf diesen zu finden sind. Die Aktivierung der DZ erfolgt durch die Erkennung von pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMP) der Erreger durch Toll-like Rezeptoren (TLR) auf den DZ [58, 84, 85]. Im Rahmen der T-Zell-Aktivierung führt die Kombination aus Signal 1 und Signal 2 zu einer Induktion der Produktion von IL-2 (Interleukin-2), sowie der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors, die zusammen mit den schon auf den naiven T-Zellen exprimierten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten einen hochaffinen IL-2 Rezeptor bilden. Die Bindung des IL-2 an seinen IL-2 Rezeptor führt in Kombination mit Signal 1 und Signal 2 zu einer Proliferation der T-Zellen. Dieser Vorgang, bei dem aus einer T-Zelle tausende T-Zellen mit der gleichen Rezeptorspezifität entstehen, wird als klonale Expansion bezeichnet [65, 86].

In Folge ihrer Aktivierung produzieren DZ verschiedene Zytokine, die darüber entscheiden, in welchen Subtyp die T-Lymphozyten differenzieren (**Signal 3**) [58]. So produzieren sie z.B. das Interleukin-12 (IL-12), ein Zytokin, das dafür sorgt, dass eine Immunantwort in Richtung einer  $T_H1$  Antwort verläuft [87]. Zu Signal 3 tragen neben IL-12 auch  $TNF\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) und andere Zytokine bei. Es handelt sich dabei sowohl um Zytokine, die von den DZ freigesetzt werden, als auch um autokrin wirkende Zytokine, die die T-Zellen selbst produzieren [58, 65]

Bei den  $CD4^+$  T-Zellen gibt es distinkte T-Zell-Populationen mit einer prinzipiell identischen Rezeptorausstattung, die sich jedoch aufgrund ihrer Zytokinproduktion in verschiedene Subtypen voneinander abgrenzen lassen. Es kann zwischen  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H9$  und  $T_H17$  Zellen unterschieden werden [68, 70, 71].  $T_H1$  Zellen spielen bei der zellulären Immunität eine Rolle und zeichnen sich durch eine Produktion von IL-2 und  $IFN\gamma$  aus, während  $T_H2$  Zellen IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren und in die humorale Immunität involviert sind [71].  $T_H17$  Zellen produzieren hingegen das proinflammatorische Zytokin Interleukin-17 (IL-17) und sind an Inflamationsprozessen beteiligt [69, 70]. Bei der noch am jüngsten entdeckten Subpopulation der  $CD4^+$  T-Zellen handelt es sich um die  $T_H9$  Zellen, die ihrem Namen entsprechend IL-9 produzieren [68]. Da für die Abwehr der intrazellulären Bakterien die  $T_H1$  Zellen die größte Rolle spielen, wird im Folgenden auf die Darstellung der anderen Subpopulationen verzichtet.

Für die Differenzierung der  $CD4^+$  T-Zellen in die  $T_H1$  Subpopulation sind die Zytokine IL-12 und Interferon $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ) notwendig [87, 88]. Das  $IFN\gamma$  sorgt dabei für eine Aktivierung des signalvermittelnden Proteins *stat1*, das wiederum T-Zellen zur Expression des Transkriptionsfaktors T-bet anregt. T-bet selbst induziert die Expression einer IL-12 Rezeptor Untereinheit und aktiviert das Gen für  $IFN\gamma$  innerhalb der T-Zellen. Durch die Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor wird wiederum *stat4* aktiviert, das schlussendlich zur Differenzierung der  $CD4^+$  T-Zellen in die  $T_H1$  Subpopulation führt [58, 65, 89]. Für die Differenzierung von  $CD8^+$  T-Zellen in ZTL wird das gleiche Zytokin-Milieu wie zur Differenzierung der  $CD4^+$  T-Zellen in  $T_H1$  Zellen benötigt. Der Unterschied liegt lediglich in der Bindung des TZR an den MHC-I Molekül-Antigen-Komplex auf DZ, wie es für  $CD8^+$  T-Zellen üblich ist [90]. Sobald sich die T-Zellen in die notwendige Subpopulation differenziert haben, gelangen sie über den Blutstrom zu dem Ort der Infektion, um dort ihren jeweiligen Aufgaben nachgehen zu können.

### Funktionen der $T_H1$ und ZTL Subpopulationen:

Die T-Zellen der  $T_H1$  Subpopulation sind durch ihre Produktion von  $IFN\gamma$  für die Aktivierung von Makrophagen zuständig, die wiederum die Pathogene und somit auch intrazelluläre Bakterien aufnehmen und in ihren Phagosomomen zerstören sollen (siehe Kapitel 1.2) [58–60]. Bei intrazellulären Bakterieninfektionen sind besonders ZTL gefragt, die direkt für die Abtötung der infizierten Zellen sorgen, wobei mehrere Schritte durchlaufen werden. Zunächst müssen die ZTL über den T-Zell-Rezeptor mit ihren infizierten Zielzellen und dem darauf über MHC-I präsentierten Antigenfragment in Kontakt treten. Durch die Bindung setzen die ZTL zytotoxische Granula frei, in denen sich zytotoxische Proteine, wie z.B. Perforin und Granzyme (Serinproteasen) befinden. Über das Adhäsionsmolekül LFA-1 (Komplex aus CD11a und CD18), das auf der Oberfläche von ZTL liegt und an ICAM (engl. *intercellular adhesion molecule*) auf der Zielzelle bindet, wird eine immunologische Synapse ausgebildet, die für eine spezifische Kontaktstelle zwischen ZTL und Zielzelle sorgt [65, 91]. Gleichzeitig sorgen sie dafür, dass die Granula in die Nähe der immunologischen Synapse gelangen, um dort ihre zytotoxischen Proteine zielgerichtet freisetzen zu können. Das aus den Granula freigelassene Perforin bildet kleine Poren, durch die Calciumionen ( $Ca^{2+}$ ) in die Zielzelle gelangen. Durch die entstehenden elektrostatischen Wechselwirkungen lagern sich Granzyme an die Zielmembran an und werden durch Endozytose aufgenommen [65, 92]. Das eindringende Granzym A führt zu einer Schädigung der Mitochondrien in der Zielzelle, die zum Zelltod führt. **Granzym B** (GrzB) hingegen sorgt für eine Spaltung und Aktivierung der Caspase-3, die wiederum als Effektorcaspase ein Bestandteil einer Enzymkaskade zur Einleitung der Apoptose und somit für die Bekämpfung der infizierten Zielzellen ist [65, 93].

### Aktivierungsmarker - Veränderung der ZTL nach der Aktivierung:

Aktivierte T-Zellen exprimieren ein anderes Repertoire an Oberflächenrezeptoren als naive T-Zellen. Diese Marker können zur Identifikation mittels Durchflusszytometrie genutzt werden. So konnte bereits gezeigt werden, dass **CD11a** ( $\alpha$ -L-Integrin) als eine Untereinheit des zur immunologischen Synapse gehörenden Adhäsionsmoleküls LFA-1 (CD11a/CD18) zum Beispiel nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* auf  $CD8^+$  T-Zellen erhöht exprimiert vorliegt [94]. LFA-1 ist ein  $\beta_2$  Integrin und bindet an seine Liganden ICAM-1 und 2. Vor der Bindung an seine Liganden muss LFA-1 jedoch zunächst aktiviert werden [95]. Die Aktivierung kann neben Chemokinen auch z.B. durch den TZR und CD3 sowie CD28 ausgelöst werden [96, 97]. Neben der Hochregulation von CD11a regulieren die  $CD8^+$  T-Zellen das Zell-Adhäsionsmolekül L-Selektin (**CD62L**), das für die Rekrutierung der T-Zellen zum Ort der Infektion verantwortlich ist, herunter und verlassen das lymphatische System in Richtung des Infektionsortes [94, 98]. CD62L bindet bevorzugt an GlyCAM-1 (engl. *glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*), das sich auf hochendothelialen Venolen befindet [99]. In Patienten mit dem Tsutsugamushi-Fieber korreliert das Serumlevel an löslichem L-Selektin mit den Symptomen der Krankheit [100]. Auch während einer LCMV Infektion konnte gezeigt werden, dass gerade zum Peak der Infektion die  $CD8^+$  T-Zellen meistens  $CD62L^{niedrig}$  sind [101]. Zudem weisen

die CD62L<sup>niedrig</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen den typischen Effektormarker **KLRG1** (engl. *killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*) auf [101]. KLRG1 gilt als Marker für terminal differenzierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen [102]. KLRG1<sup>+</sup> T-Zellen besitzen eine stabile Effektorfunktion, ihnen fehlt jedoch die Fähigkeit zu proliferieren. Während des Differenzierungsprozesses in ZTL tauschten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen das CD28 gegen das inhibitorische Molekül KLRG1 aus. Es besitzt ein ITIM Motiv (engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), das inhibierend auf den Signalweg wirkt und somit die Proliferation verhindert [103, 104]. Ein Fehlen von KLRG1 in KLRG1-defizienten Mäusen hat jedoch bei einer LCMV Infektion keinen Einfluss auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollmäusen. KLRG1 scheint demnach zumindest bei einer LCMV Infektion nicht essentiell zu sein [105]. Bei der Hauptaufgabe der ZTL, infizierte Zielzellen durch Apoptose abzutöten, spielt unter anderem die Serinprotease GrzB eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 1.3.1) und dient somit ebenfalls als ein geeigneter Aktivierungsmarker für CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Da es jedoch in Granula lokalisiert ist, muss es für durchflusszytometrische Analysen intrazellulär gefärbt werden. De Fost *et al.* konnten in Patienten mit dem Tsutsugamushi-Fieber im Serum einen Anstieg an löslichem GrzB nach der Infektion nachweisen [106].

Auch die Ausschüttung von Zytokinen kann einen hilfreichen Anhaltspunkt über den Aktivierungszustand der T-Zellen nach einer Infektion geben. Jerrells *et al.* zeigten in Mäusen, die mit *O. tsutsugamushi* infiziert wurden, einen Anstieg an TNF $\alpha$  im Serum, was zum einen zur Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen (u. a. P-Selectin, E-Selectin und ICAM-1) führt und zum anderen eine lokale inflammatorische Antwort generiert [100, 107]. Ebenso liegt IFN $\gamma$ , sowohl im Serum als auch durch T-Zellen produziert, in *O. tsutsugamushi* infizierten Mäusen erhöht vor [30, 77]. Dort spielt das Zytokin eine wichtige Rolle für eine effektive Bekämpfung von *O. tsutsugamushi* durch Makrophagen [108, 109]. Doch nicht nur im Mausmodell, sondern auch in Patienten mit dem Tsutsugamushi-Fieber konnte eine erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion im Blutplasma nachgewiesen werden [110].

Ein gemeinsames Charakteristikum vieler infektionsinduzierter T-Zell-Antworten ist, dass die Immunantwort wieder abnimmt, sobald das Pathogen bekämpft wurde, um so eine Immunpathologie durch chronische Entzündungsreaktionen zu vermeiden. Deshalb wird schon bei der T-Zell-Aktivierung ihre Deaktivierung durch eine Hochregulation koinhibitorischer Rezeptoren mit induziert [65, 111].

### 1.3.2 T-Zell-Regulation

Eine Immunantwort hängt immer von einem Gleichgewicht zwischen Reaktionen, die einerseits die Infektion kontrollieren und auf der anderen Seite einer umgekehrten Antwort, die Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen vorbeugen, ab [111]. Das Immunsystem muss also zunächst eine Immunantwort gegen einen Erreger zulassen, um ihn bekämpfen zu können. Gleichzeitig muss eine überschießende Reaktion, verbunden mit Gewebsschädigungen, verhindert werden [65, 111]. Der Mechanismus, mit dem die Immunantwort nach der T-Zell-Aktivierung wieder gebremst wird, wird als periphere Toleranz bezeichnet und erfolgt durch regulatorische T-Zellen (Tregs). Bei den Tregs wird zwischen den zwei großen Subpopulationen natürliche Tregs (nTregs) und induzierbare Tregs

(iTregs), zu denen wiederum verschiedene Populationen gehören, unterschieden [65, 112].

### Natürliche Tregs (nTregs)

Bei den natürlichen Tregs handelt es sich um die wichtigste Gruppe der regulatorischen T-Zellen, die 1995 erstmals von Sakaguchi *et al.* entdeckt wurden [113]. Die Entstehung der CD4<sup>+</sup> nTregs erfolgt direkt im Thymus, woraufhin sie dann in das periphere Gewebe einwandern, um dort die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen zu unterdrücken [111, 114, 115]. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass eine Depletion der Tregs zu einer Ausbildung spontaner Autoimmunerkrankungen bei Nagern führt [116]. Bopp *et al.* konnten bereits zeigen, dass nTregs ein hohes Level an cAMP (engl. *cyclic adenosine monophosphate*) besitzen, das Membranen verschiedener Zellen über Kontaktstellen überqueren kann und einen möglichen Inhibitor der T-Zell-Proliferation und IL-2 Synthese darstellt [117].

Die nTregs machen etwa 5-10 % der peripheren T-Zellen in der Maus aus und weisen eine hohe Expression des IL-2 Rezeptors CD25 auf [111]. Des Weiteren exprimieren sie, wie nahezu alle Tregs, den Transkriptionsfaktor **Foxp3** (engl. *forkhead box p3*). Allerdings dient Foxp3 nur in Mäusen als Marker für Tregs, da in Menschen Foxp3 auch auf aktivierten T-Zellen hochreguliert wird [118]. nTregs zeigen zudem eine gesteigerte Expression des inhibitorischen kostimulatorischen Moleküls **CTLA-4** (engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*), das eine wichtige Rolle im supprimierenden Mechanismus der nTregs über Zell-Zell-Kontakte übernimmt [111, 119, 120]. CTLA-4 interagiert dabei mit CD80 und/oder CD86 auf der Oberfläche der APZ, wie z. B. DZ, und verhindert hier eine weitere Kostimulation der T-Zellen (Signal 2) und somit die erfolgreiche T-Zell-Aktivierung und Proliferation (weitere Details zu CTLA-4 siehe Kapitel 1.3.3) [111].

Auch während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* konnten bereits nTregs nachgewiesen werden, allerdings zeigten Cho *et al.* in diesem Zusammenhang im Blut von Patienten mit dem Tsutsugamushi-Fieber eine Reduktion der nTregs sowohl während der akuten Phase als auch während der Rekonvaleszenzzeit [121]. Bei anderen Infektionen, wie z. B. mit *M. tuberculosis* oder Vaccinia Virus, konnte hingegen eine Zunahme an Tregs im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollgruppen gezeigt werden [122, 123]. Während einer Wurminfektion mit *Strongyloides ratti* konnte die Zunahme der nTregs sogar mit einer verbesserten Wurmabwehr in Verbindung gebracht werden [124].

### Induzierbare Tregs (iTregs)

Neben den nTregs stellen die induzierbaren Tregs (iTregs) die zweite wichtige Subpopulation regulatorischer T-Zellen dar. Bei den iTregs wird weiter zwischen drei Subpopulationen unterschieden. Sie entstehen alle in der Peripherie aus naiven CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, jedoch erst nach der Präsentation eines Antigenes durch DZ. iTregs expandieren demnach antigen-spezifisch aus zuvor antigen-spezifisch aktivierten naiven T-Zellen, was sie im Wesentlichen von den nTregs unterscheidet [125]. Ob DZ wie im Kapitel 1.3.1 beschrieben CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Differenzierung von T<sub>H</sub>1 Zellen bzw. ZTLs

veranlassen, oder wie hier beschrieben eine Induktion von iTregs auslösen, hängt dabei stark von ihrem Reifungszustand ab [126–129]. Für die Induktion von iTregs sind unreife DZ verantwortlich, die einen intermediären Phenotyp, bestehend aus einer gesteigerten MHC und CD86 Expression sowie einer geringen Expression des kostimulierenden Moleküls CD40 und des Adhäsionsmoleküls ICAM1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*) aufweisen [126, 128, 130–132]. Der Vorgang ist dabei spezifisch für das Antigen, dem die DZ zuvor ausgesetzt wurden [126]. Gleichzeitig steht die Induktion der iTregs unter dem Einfluss von Zytokinen wie Interleukin-10 (IL-10), Transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) und IFN $\gamma$ . Aus den CD8<sup>+</sup> T-Zellen gehen sogenannte CD8<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen hervor, während die CD4<sup>+</sup> T-Zellen einerseits zur Differenzierung in T<sub>H3</sub> Zellen (T Helfer Zellen Typ 3) und andererseits in T<sub>R1</sub> Zellen (Regulatorischer T-Zell Typ 1) veranlasst werden. Die T<sub>R1</sub> Zellen wurden erstmals 2002 von McGuirk *et al.* in einer *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) Infektion in Mäusen gezeigt, bei denen die T<sub>R1</sub> Zellen spezifisch für das bakterielle Antigen waren und supprimierend auf die T<sub>H1</sub> Zellen einwirkten [130].

Im Gegensatz zu den nTregs wählen die iTregs nicht den Zell-Zell-Kontakt, um auf die Immunantwort einzuwirken, sondern sekretieren immunsupprimierende Zytokine [111]. So erreichen die CD8<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen ihre immunsuppressive Funktion durch die Produktion von IL-10 und TGF $\beta$  [133, 134]. Die CD4<sup>+</sup> T<sub>H3</sub> Zellen produzieren ebenfalls große Mengen an TGF $\beta$  und variierende Mengen an IL-10 sowie IL-4 [111]. Eine Ausnahme innerhalb der Tregs bilden die ebenso zu den iTregs gehörenden T<sub>R1</sub> Zellen. Als einzige Treg Subpopulation exprimiert sie kein Foxp3 und nur wenig CD25 [65]. Die Zytokinproduktion ist jedoch durch die Sekretion von IL-10 und TGF $\beta$  vergleichbar mit den anderen iTregs [111]. Bei den iTregs inhibiert das IL-10 dabei die Produktion von TNF $\alpha$  und IL-12 durch DZ und Makrophagen sowie die IFN $\gamma$ -Produktion der T-Zellen [111]. Das TGF $\beta$  hemmt hingegen die T<sub>H1</sub> Zellantworten, indem es auf die Expression des Transkriptionsfaktors Tbet und des IL-12R einwirkt [135–137]. Es wurde bereits gezeigt, dass die Produktion von TGF $\beta$  durch Tregs eine Induktion der IL-10-Produktion durch T<sub>H1</sub> Zellen herbeiführt, indem es zu einer Aktivierung des IL-10 Promotors über das Gen SMAD4 (engl. *SMAD Family Member 4*) führt [138].

Durch die Sekretion der immunsupprimierenden Zytokine unterstützen die iTregs die T-Zell-Regulation bei Infektionen vor allem mit Pathogenen, die in ihrem Wirt persistieren oder eine chronische Infektion auslösen [111]. Zu der Rolle der iTregs während einer *O. tsutsugamushi* Infektion liegen bisher keine Informationen vor. Allerdings konnte für die *B. pertussis* Infektion gezeigt werden, dass T<sub>R1</sub> Zellen dabei helfen, pathologische Effekte durch Entzündungsreaktionen zu verhindern. Außerdem verbessern sie die Bekämpfung der Pathogene, indem sie Schädigungen der begeißelten Epithelzellen, die für die Beseitigung von Bakterien aus der Lunge benötigt werden, vorbeugen [111].

Obwohl Tregs eine entscheidende Rolle dabei spielen, eine Immunpathologie im Wirt zu verhindern, können sie im Gegensatz dazu auch nützlich für Pathogene sein, indem sie ihnen erleichtern, eine chronische Infektion zu entwickeln. Viele Pathogene haben Strategien entwickelt, das Immunsystem des Wirtes zu umgehen, um ihre eigene Persistenz zu ermöglichen. Dies erreichen sie einerseits, indem sie das Immunsystem durch die Produk-

tion von immunsupprimierenden Zytokinen inhibieren, oder aber andererseits, indem sie direkt mit den Effektormechanismen interagieren. So inhibieren  $T_R1$  Zellen zum Beispiel bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* die  $T_H1$  Immunantwort über die Produktion von IL-10, so dass der Erreger nicht erfolgreich bekämpft werden kann [111]. Für *B. pertussis* konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Persistenz des Bakteriums direkt mit der Induktion von IL-10 produzierenden  $CD4^+$   $T_R1$  Zellen assoziiert werden kann, und das Bakterium so gezielt der  $T_H1$  Immunantwort des Wirtes entgeht [111].

### 1.3.3 T-Zell-Koinhibition

Neben den Tregs besitzen T-Zellen nach ihrer Aktivierung spezielle koinhibitorische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die zur T-Zell-Regulation beitragen [65]. Die negative Regulation spielt sowohl bei akuten als auch bei chronischen Infektionen eine Rolle, jedoch unterscheiden sich die Funktionen je nach Phase der Infektion. Während der akuten Phase der Infektion werden negative Koinhibitoren vorübergehend exprimiert, um die Immunantwort einzuschränken und eine Überaktivierung zu verhindern [139–143]. Bei vielen chronischen Infektionen verlieren die zuvor aktivierten antigenspezifischen Effektor T-Zellen im Verlauf der Zeit ihre Funktionalität und erreichen einen Erschöpfungszustand [144]. Die sogenannten erschöpften T-Zellen zeichnen sich durch Defekte bei ihrer Proliferation, IL-2-Produktion und Zytotoxizität sowie eine fehlende Produktion von  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$  aus [145]. Im Gegensatz dazu exprimieren sie hohe Level an koinhibitorischen Rezeptoren, die ihre Liganden auf den APZ finden [146, 147].

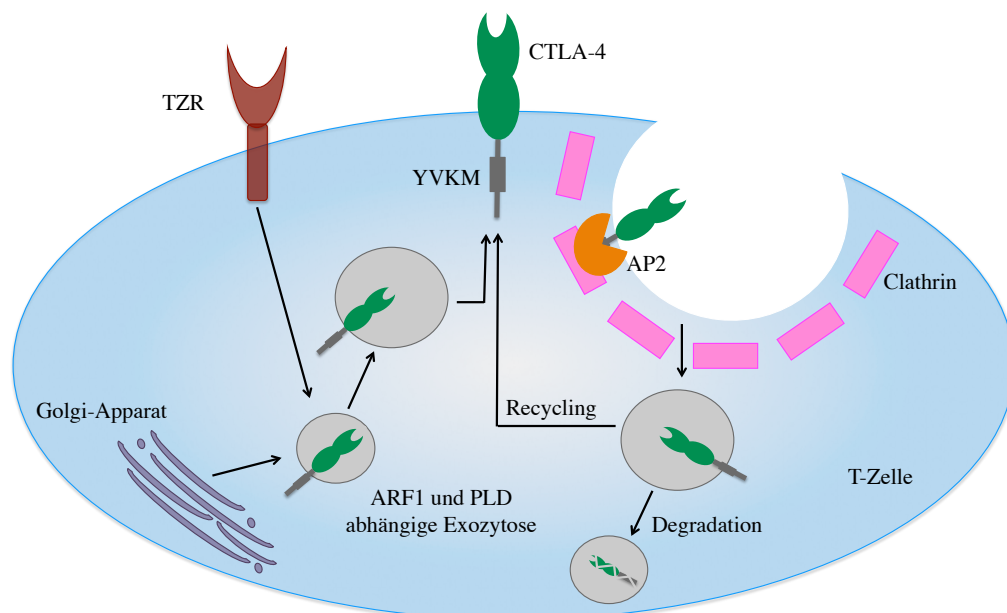
Die Regulation der Immunantwort durch koinhibitorische Rezeptoren bietet jedoch nicht nur einen Schutz vor Autoimmunität oder Immunpathologie. Sie kann zudem effektive Immunantworten, die für die Bekämpfung von Pathogenen benötigt werden, verhindern [145]. So konnte in diesem Zusammenhang bereits gezeigt werden, dass eine Blockade diverser inhibitorischer Rezeptoren die Immunität gegenüber verschiedener Pathogene steigern kann [144].

Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf den inhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*), PD-1 (engl. *programmed death 1*), TIM-3 (engl. *T cell immunoglobulin and mucin 3*) und LAG-3 (engl. *lymphocyte-activation gene 3*). Im Verlauf des Kapitels wird auf ihre jeweiligen Besonderheiten sowie ihre inhibitorischen Rezeptormechanismen näher eingegangen.

#### 1.3.3.1 CTLA-4

Das zytotoxische T-Lymphozyten Protein 4 (CTLA-4), auch bekannt als CD152, gehört zusammen mit dem kostimulatorischen Molekül CD28 zur Immunglobulin-Superfamilie. Die Gene von CD28 und CTLA-4 weisen eine Sequenzhomologie von 75 % auf [148]. Beide sind Homodimere aus zwei 35 kDa großen Glykoproteinen, die über Disulfidbrücken kovalent verbunden sind [149, 150]. Strukturell gesehen weist CTLA-4 eine extrazelluläre V-Domäne, eine Transmembranregion sowie einen kurzen zytoplasmatischen Teil auf. Es gibt jedoch auch lösliche Varianten von CTLA-4, die aufgrund von alternativen Spleißvor-

gängen keine Transmembrandomänen mehr aufweisen [151]. Bei der membrangebundenen Form liegt der zytoplasmatische Teil jedoch in Mensch und Maus zu 100 % konserviert vor [152, 153]. CTLA-4 bindet wie CD28 an die Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), die auf APZ lokalisiert zu finden sind. Dabei weist CTLA-4 eine 50-100 fach erhöhte Bindungsaffinität im Vergleich zu CD28 auf, wobei es eine Bindung an CD80 bevorzugt [154–156]. Exprimiert wird CTLA-4 etwa zwei bis drei Tage nach der Antigenpräsentation auf aktivierten T-Zellen, Tregs und Gedächtnis T-Zellen (siehe Kapitel 1.3.4) [65, 157]. Dabei ist jedoch nur ein geringer Anteil an CTLA-4 auf der Oberfläche der Zellen zu finden. Die Mehrheit befindet sich in intrazellulären Kompartimenten und wird nur in Antwort auf eine TZR Ligation an die Oberfläche transportiert [158, 159]. Dazu wird CTLA-4 nach seiner Synthese vom Golgi-Apparat über einen speziellen Mechanismus (siehe Abbildung 1.6), der von den Enzymen ARF-1 (engl. *ADP-ribosylation factor 1*) und Phospholipase D (PLD) abhängig ist, zur Plasmamembran transportiert [160, 161].



**Abbildung 1.6: Intrazellulärer Transport von CTLA-4.**

Das Besondere an CTLA-4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*) ist die Wanderung des Rezeptors zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten. Generell liegt die Mehrheit an CTLA-4 intrazellulär vor. Nach der Bildung von CTLA-4 wird dieses vom Golgi-Apparat über einen Mechanismus, der von den Enzymen ARF-1 (engl. *ADP-ribosylation factor 1*) und Phospholipase D (PLD) abhängig ist, zur Plasmamembran transportiert. CTLA-4 enthaltene Vesikel fusionieren dabei mit der Plasmamembran und entlassen das CTLA-4 an der Oberfläche. Das CTLA-4 wird anschließend von Clathrin ausgekleideten Poren internalisiert. Es interagiert dabei mit seinem zytoplasmatischen YVKM Motiv mit dem Clathrin Adaptor Komplex (AP2) innerhalb der Poren. Daraufhin wird der Rezeptor entweder wiederverwertet oder aber degradiert. In Anlehnung an [160].

Man geht davon aus, dass CTLA-4 enthaltene Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren und so das CTLA-4 an der Oberfläche entlassen. Das CTLA-4 wird jedoch innerhalb von wenigen Minuten wieder von speziellen mit Clathrin ausgekleideten Poren internalisiert. Dabei interagiert CTLA-4 mit seinem zytoplasmatischen YVKM Motiv mit dem Clathrin Adaptor Komplex AP2 innerhalb der Poren [157, 162, 163]. Schon nach fünf Minuten sind mehr als 80 % des CTLA-4 Moleküls von der Oberfläche internalisiert und liegen wieder intrazellulär in Vesikeln vor, bis sie entweder wiederverwertet oder aber in



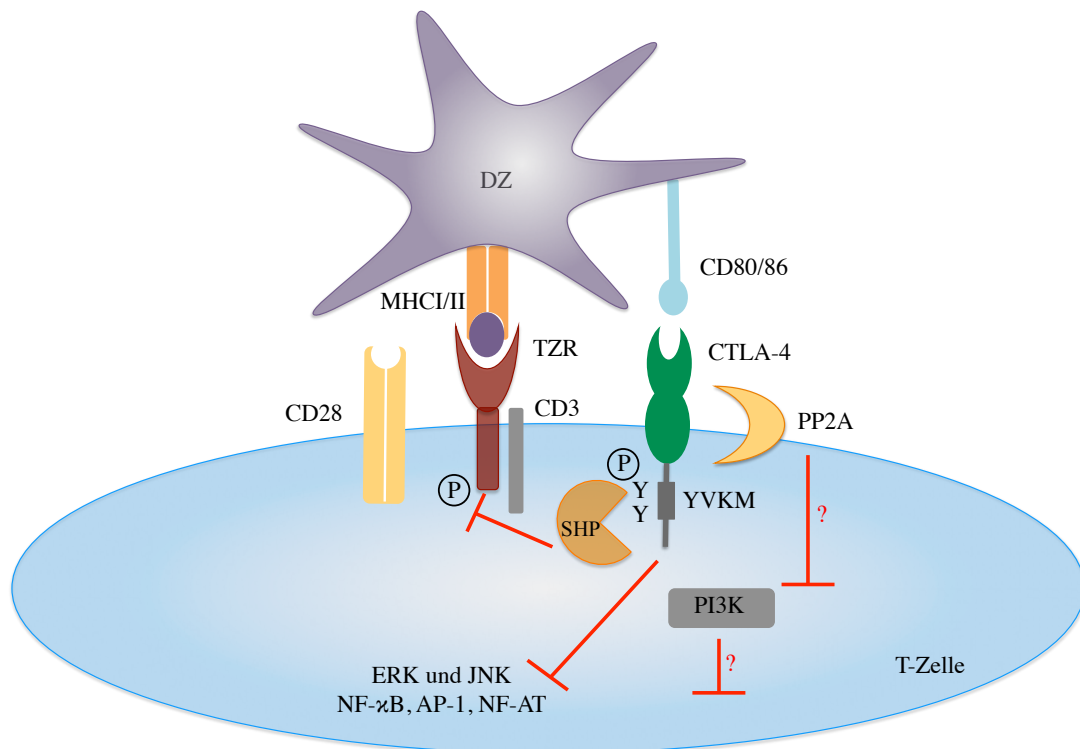
lysosomalen Kompartimenten degradiert werden. Funktionell gesehen dient CTLA-4 als koinhibitorischer Rezeptor der Vorsorge einer massiven T-Zell-Infiltration in die Gewebe sowie der Vermeidung einer Autoimmunität [157]. Um seinen Funktionen nachgehen zu können, nutzt CTLA-4 sowohl intrinsische als auch extrinsische Mechanismen.

#### **Extrinsische CTLA-4 Funktionen:**

Eine Möglichkeit, bei der CTLA-4 seine Funktion auf eine extrinsische Art wahrnimmt, ist bei der Bindung an seine Liganden CD80/CD86 auf APZ, um dort ein reverses Signal einzuleiten. Die Bindung von CTLA-4 führt zur Aktivierung der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), einem Enzym, das die Aminosäure Tryptophan abbaut und somit zu einer Inhibierung der T-Zell-Proliferation führt [164]. Ein weiterer extrinsischer Mechanismus von CTLA-4 ist die Induktion von inhibitorischen Zytokinen, wie TGF $\beta$ , die nach der Bindung von CTLA-4 an die APZ von T-Zellen freigesetzt werden und daraufhin die APZ- oder T-Zell-Funktion hemmen können [165]. Des Weiteren kann CTLA-4 die Verfügbarkeit der Liganden begrenzen, indem es an seine Liganden CD80/86 bindet und diese so für CD28, das in der Regel an die gleichen Liganden bindet, jedoch eine geringere Affinität besitzt, unzugänglich macht [166]. Die T-Zellen werden so vor weiteren Aktivierungssignalen geschützt. Dieser Wettstreit um einen Liganden kann zum einen auf der Zelloberfläche der regulierenden Zellen, oder aber über lösliche Varianten von CTLA-4 stattfinden [167, 168]. Es gibt jedoch auch Studien, die ein weiteres Modell der extrinsischen Funktionsweise von CTLA-4 beschreiben. Dabei wird nach der Bindung von CTLA-4 an seine Liganden der CTLA-4/CD80- oder CTLA-4/CD86-Komplex mittels Transendozytose in die T-Zelle internalisiert [169]. Dies führt zu einer geringeren Verfügbarkeit des Liganden auf der Zelloberfläche von APZ [170]. Auch dieser Mechanismus, der sowohl von Tregs als auch von jeder anderen aktivierten CTLA-4 exprimierenden T-Zelle genutzt werden kann, verhindert die CD28 Kostimulation und somit die T-Zell-Aktivierung [160].

#### **Intrinsische CTLA-4 Funktionen:**

Neben der extrinsischen Funktionsweise kann CTLA-4 auch intrinsisch auf die T-Zell-Immunantwort einwirken, indem es direkt negative Signale innerhalb der T-Zelle auslöst und so ihre Aktivierung und Proliferation inhibiert [160]. Da der zytoplasmatische Teil von CTLA-4 selbst keine enzymatische Aktivität aufweist und auch kein ITIM Motiv, wie z.B. PD-1 (siehe Kapitel 1.3.3.2), muss das inhibitorische Signal auf einem anderen Weg vermittelt werden, wobei der vollständige Signalweg noch nicht bekannt ist (siehe Abbildung 1.7) [144].



**Abbildung 1.7: Signalweg von CTLA-4.**

CTLA-4 besitzt an seinem zytoplasmatischen Teil zwei Tyrosinreste (Y) an den Positionen 201 und 218 sowie eine prolinreiche Region (P). Y201 befindet sich innerhalb eines YVKM Motivs. CTLA-4 ist in der Lage, an PP2A (Serin/Threonin Protein Phosphatase 2A) zu binden, wobei die inhibitorischen Folgen noch unklar sind. Eine Aktivierung des TZR führt zu einer Phosphorylierung der Tyrosinreste des CTLA-4 Moleküls. Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung eine Internalisierung von CTLA-4 verhindert. Das Y201 rekrutiert die PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase), jedoch ist die genaue Funktion noch nicht untersucht. Eine Bindung von SHP (SH2 enthaltene Tyrosin Phosphatase) an CTLA-4 ruft eine Dephosphorylierung des CD3 $\zeta$  Komplexes, verbunden mit der Inaktivierung des TZR-abhängigen Signalweges, hervor. Dabei wird die Aktivierung der MAP- (engl. *mitogen-activated protein*) Kinasen ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) und JNK (engl. *Jun N-terminal kinase*) sowie der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*), AP-1 und NF-AT (engl. *nuclear factor of activated T cells*) inhibiert. In Anlehnung an [171].

CTLA-4 besitzt am zytoplasmatischen Teil zwei Tyrosine (Y) an den Positionen 201 und 218, sowie eine C-terminale prolinreiche Region (P). Y201 befindet sich innerhalb eines YVKM Motivs, ähnlich zu dem YNMN Motiv von CD28 [171]. Im dephosphorylierten Zustand bindet das Motiv an das AP2 des Clathrins, was zur clathrin-vermittelten Endozytose von CTLA-4, verbunden mit einer verminderten CTLA-4 Expression an der Zelloberfläche, führt [157, 162, 163]. CTLA-4 assoziiert zudem mit der Serin/Threonin Protein Phosphatase 2A (PP2A), wobei die Funktion bisher ungeklärt ist [171, 172]. Durch eine TZR-vermittelte Aktivierung der T-Zellen wird das Tyrosin (Y) des CTLA-4 Moleküls über SRC Kinasen (wie z.B. Fyn, Lyn und Lck) phosphoryliert [171, 173]. Inwieweit diese Phosphorylierung jedoch notwendig ist, damit CTLA-4 mit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und der SH2 enthaltenden Protein Tyrosin Phosphatase (SHP-2) in Verbindung treten kann, ist bisher noch umstritten. Fest steht jedoch, dass die Y201 Region des CTLA-4 PI3K rekrutiert [171]. Des Weiteren kann die Verbindung von SHP-2 mit CTLA-4 zu einer Dephosphorylierung des CD3 $\zeta$  Komplexes, gefolgt von einer Inaktivierung des TZR-abhängigen Signalweges, führen [171, 174]. Für die Vernetzung von CTLA-4 wurde gezeigt, dass sie die TZR abhängige Aktivierung der MAP- (engl. *mitogen-activated protein*) Kinasen ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) und JNK (engl. *Jun N-terminal kinase*)

*terminal kinase*) sowie der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor- $\kappa$ B*), AP-1 und NF-AT (engl. *nuclear factor of activated T cells*) inhibiert [175–177].

Auch wenn der genaue Signalweg bisher nicht vollständig bekannt ist und somit nicht genau gesagt werden kann, über welchen Mechanismus CTLA-4 sein inhibitorisches Signal weitergibt, führt seine Expression immer zu einer verminderten IL-2-Produktion und einer verminderten Expression des IL-2 Rezeptors auf T-Zellen [178]. Durch die verminderte Zytokinproduktion der T-Zellen wird ein Stillstand im Zellzyklus ausgelöst [171]. Der Übergang in die S1-Phase wird verhindert, so dass die Zellen in der G1-Phase verbleiben [179]. CTLA-4 führt somit schon zu frühen Zeitpunkten der T-Zell-Aktivierung seine Funktion als koinhibitorisches Molekül aus [180].

Auch eine klinische Relevanz kann CTLA-4 zugesprochen werden. So konnte bei einem Fehlen von CTLA-4 in Mäusen die Ausbildung einer massiven Lymphoproliferation gezeigt werden [181]. Eine heterozygote Keimbahnmutation von CTLA-4 führt hingegen im Menschen zu einer fehlerhaften Regulation der Tregs, hyperaktiven T-Effektor-Zellen und einer Lymphozyteninfiltration der Organe [182]. Bei der Behandlung von Krebspatienten wird jedoch inzwischen erfolgreich  $\alpha$ -CTLA-4 unter den Namen Ipilimumab und Tremelimumab eingesetzt [183].

In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass koinhibitorische Moleküle auch effektive Immunantworten, die für die Bekämpfung von Pathogenen benötigt werden, verhindern können [145]. So wurde auch für CTLA-4 gezeigt, dass seine Blockade die Immunität gegenüber verschiedener Pathogene steigern kann. Pedicord *et al.* blockierten CTLA-4 während einer *L. monocytogenes* Infektion und erreichten so in Milz und Leber einen relativen Anstieg von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einer gesteigerten Effektorfunktion in Verbindung mit einer verbesserten Bakterienbekämpfung [184]. Eine Blockade von CTLA-4 konnte zudem die Resistenz des Wirtes gegenüber dem intrazellulären Pathogen *Leishmania donovani* steigern [185]. Zu der Rolle von CTLA-4 während einer *O. tsutsugamushi* Infektion gibt es bisher keine Informationen.

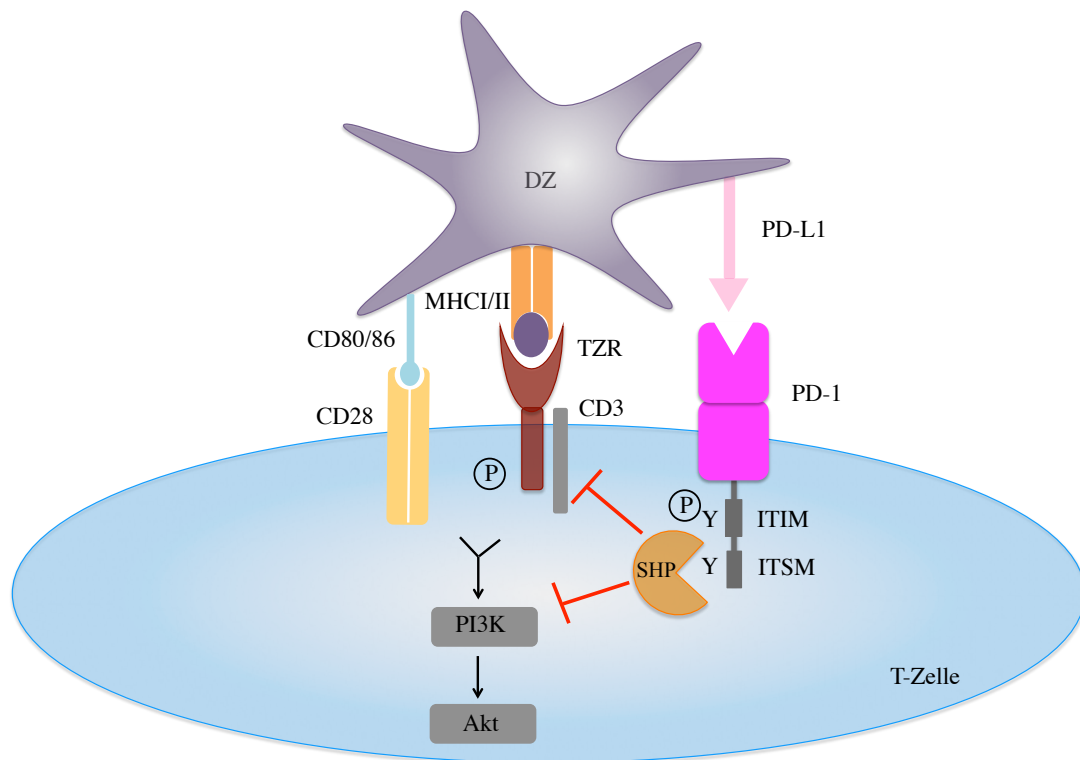
### 1.3.3.2 PD-1

PD-1 (engl. *programmed cell death 1*) ist einer der ersten inhibitorischen Rezeptoren, der mit erschöpften T-Zellen in Verbindung gebracht wurde, und gehört wie auch CTLA-4 zur CD28 Immunglobulin-Superfamilie und ist ein 50-55 kDa großes Protein mit einer V Domäne, die etwa 20 % Sequenzidentität zu CTLA-4 und CD28 aufweist [186, 187]. Im Gegensatz zu dem Homodimer CTLA-4 fehlt PD-1 der Cysteinrest, der für die Homodimerisierung benötigt wird und liegt deshalb lediglich als Monomer auf der Zelloberfläche vor [187]. Die zytoplasmatische Region des PD-1 verfügt jedoch wie CTLA-4 über zwei Tyrosinreste, wobei jedoch bei PD-1 eines mit einem ITIM Motiv und das andere mit einem ITSM Motiv ausgestattet ist, die für die inhibitorische Funktion von PD-1 essentiell sind [188, 189]. Als Liganden stehen PD-1 sowohl PD-L1 als auch PD-L2 auf DZ zur Verfügung [190]. Aber auch eine Bindung an CD80 (B7.1), das als Ligand für CTLA-4 und CD28 dient, wurde gezeigt [191]. PD-1 kann von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und DZ exprimiert werden [147, 192, 193]. Die Expressi-

on erfolgt dabei allerdings nicht auf ruhenden T-Zellen, sondern wird einerseits innerhalb von 24 h nach ihrer Stimulation eingeleitet, wobei sie vor allem durch TZR- oder BZR-vermittelte Signale induziert und durch TNF noch verstärkt wird [194, 195]. Neben der Expression während der akuten Phase einer Immunantwort kann PD-1 allerdings andererseits auch während der chronischen Phase auf erschöpften T-Zellen nachgewiesen werden [143, 186, 196]. McPherson *et al.* konnten in diesem Zusammenhang Unterschiede in der Methylierung des PD-1 Promotors zwischen dem während der akuten Phase auf aktivierten T-Zellen exprimierten und dem während der chronischen Phase auf erschöpften T-Zellen exprimierten PD-1 nachweisen [143].

Der Ligand PD-L1 wird u. a. auf T-Zellen, B-Zellen, DZ, Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen, Mastzellen aus dem Knochenmark, aber auch auf nicht hämatopoetischen Zellen der Lunge, des vaskulären Endothels, nichtparenchymalen Leberzellen, Keratinozyten und anderen exprimiert [147, 193]. PD-L2 ist hingegen auf aktivierte DZ, Makrophagen, Mastzellen und B1-Zellen beschränkt [197]. Die umfassende Expressionsvielfalt von PD-1 und seinen Liganden weist darauf hin, dass PD-1 ein breites Spektrum der Immunantwort reguliert [190]. PD-1 defiziente Mäuse entwickelten spontane Autoimmunerkrankheiten, so dass PD-1 eine Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer immunologischen Toleranz zugesprochen wird [198, 199]. PD-1 ist dabei sowohl an der zentralen als auch an der peripheren Toleranz beteiligt [190].

Die Funktion von PD-1 ist bisher am besten in T- und B-Zellen charakterisiert, wobei hier der Signalweg am Beispiel der T-Zellen (siehe Abbildung 1.8) kurz erläutert wird [190, 200].



**Abbildung 1.8: Signalweg von PD-1.**

Die Ligation des TZR mit dem Antigen über den MHC I/II Komplex der DZ sowie die Bindung von PD-1 an seinen Liganden PD-L1 führt zur Phosphorylierung (P) der Tyrosine (Y) innerhalb der ITIM und ITSM Motive von PD-1. Die Bindung von SHP an das ITSM Motiv führt zur Dephosphorylierung der proximalen Signalmoleküle, wodurch wiederum eine Aktivierung des PI3K sowie des Akt Signalweges durch eine Dephosphorylierung verhindert wird. Der PD-1 Signalweg führt zu einer verminderten T-Zell-Proliferation und einem verminderten Überleben sowie einer verringerten Proteinsynthese und IL-2-Produktion. In Anlehnung an [200] und [147].

Die Ligation des TZR mit dem MHC Komplex der DZ und die Bindung von PD-1 mit seinen Liganden PD-L1 oder PD-L2 auf den DZ führt zur Phosphorylierung (P) der Tyrosinreste (Y) der ITIM und ITSM Motive am zytoplasmatischen Teil des PD-1 [200]. Das phosphorylierte ITSM Motiv, nicht aber das ITIM Motiv, rekrutiert daraufhin die Phosphatasen SHP-1 oder SHP-2 [190, 200]. Für die inhibitorische Funktion von PD-1 ist somit nur das ITSM Motiv essentiell [190]. Die Rekrutierung von SHP-1 oder SHP-2 führt zu einer Hemmung der PI3K Aktivierung und nachfolgend zu einer Inhibition des Akt Signalweges [147, 200, 201].

Der Einfluss von PD-1 während der TZR Signalübertragung führt so dazu, dass die T-Zell-Proliferation blockiert wird, die IL-2-Produktion und die zytotoxische Funktion inhibiert werden und zudem das Überleben der T-Zellen verhindert wird [200, 202]. Die IL-2-Produktion muss von PD-1 gehemmt werden, da es in der Lage ist, die T-Zellen vor einer PD-1 Inhibition zu retten, indem es die Aktivierung von Akt über stat5 auslösen kann und somit eine PD-1 vermittelte Hemmung der Akt Aktivierung verhindern kann [200].

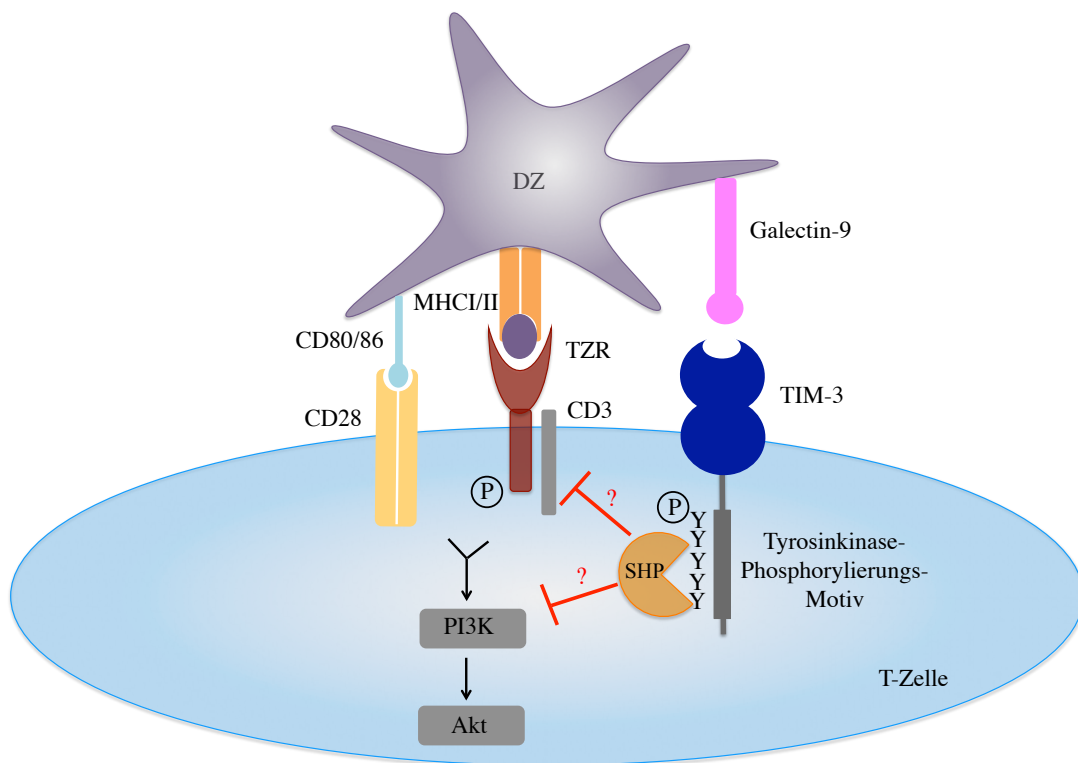
Wie schon für CTLA-4 beschrieben, werden auch Antikörper gegen PD-1 (Nivolumab) bereits erfolgreich in der humanen Krebstherapie eingesetzt [203]. Aber auch bei diversen Infektionskrankheiten spielt PD-1 eine entscheidende Rolle. So konnten Jurado *et al.* zeigen, dass eine gesteigerte Expression von PD-1 und seinen Liganden die Effektorantworten gegen Infektionen mit persistierenden Pathogenen, wie z.B. *M. tuberculosis* beeinträchtigt

[204]. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass, ähnlich zu CTLA-4, eine Modulation des PD-1 Signalweges während diverser Infektionen die Effektivität der Immunantwort gegen Pathogene steigern kann [144]. Eine späte Blockade von PD-1 während der chronischen Phase einer Infektion mit LCMV (engl. *lymphocytic choriomeningitis virus*) führte zum Beispiel zu einer gesteigerten T-Zell-Antwort, gefolgt von einer reduzierten Viruslast [186]. In PD-1 defizienten Mäusen, die einer *M. tuberculosis* Infektion ausgesetzt waren, konnte hingegen eine stark verminderte Überlebensrate im Vergleich zu Wildtypmäusen gezeigt werden. Dem PD-1 Signalweg wurde in diesem Zusammenhang eine essentielle Rolle bei der Kontrolle starker inflammatorischer Immunantworten nach einer *M. tuberculosis* Infektion in der Lunge zugesprochen [205]. Die Rolle von PD-1 während einer *O. tsutsugamushi* Infektion wurde bisher noch nicht untersucht.

### 1.3.3.3 TIM-3

Bei TIM-3 (engl. *T cell immunoglobulin and mucin-3*) handelt es sich ebenfalls um einen koinhibitorischen Rezeptor, der 2002 erstmals auf IFN $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup> Helfer T-Zellen (T<sub>H</sub>1-Zellen) sowie auf CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen in der Maus gefunden wurde [190, 206]. Später konnte TIM-3 auch auf IFN $\gamma$  produzierenden T-Zellen im Menschen nachgewiesen werden [207]. Inzwischen ist bekannt, dass TIM-3 nicht nur auf T-Zellen, sondern auch auf anderen Zellen exprimiert wird. So ist TIM-3 in naiven, nicht infizierten Mäusen, besonders auf DZ exprimiert, aber auch in geringen Mengen auf Effektor-Memory CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD44<sup>hoch</sup>CD62L<sup>niedrig</sup>) zu finden [208, 209]. *In vitro* konnte nach einer Polarisierung der T<sub>H</sub>1 Antwort ein schrittweiser Anstieg der TIM-3 Expression gezeigt werden, bis diese auf terminal differenzierten (KLRG1<sup>+</sup>) T<sub>H</sub>1 Zellen ein hohes, stabiles Expressionsniveau erreichten [206, 210]. Bei Patienten mit chronischen viralen Infektionen wurde TIM-3 auf erschöpften T-Zellen nachgewiesen, die nicht in der Lage waren, eine effektive Immunantwort gegen Viren zu generieren [211, 212]. Im Menschen ist TIM-3 generell in hohen Mengen auf DZ und in geringeren Mengen auf Monozyten vorzufinden [208]. TIM-3 besteht in der Maus aus 281 Aminosäuren und gehört ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie [144, 190, 213]. Im Menschen weist TIM-3 eine Länge von 302 Aminosäuren auf und zeigt auf Aminosäureebene eine Identität von 63 % mit TIM-3 in der Maus. TIM-3 besitzt eine variable V-Domäne sowie eine Mucindomäne [206]. Die V-Domäne besteht dabei aus zwei anti-parallelen  $\beta$ -Faltblättern, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden vorliegen [190]. Darüber hinaus verfügt TIM-3 als einziges Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie über zwei weitere unveränderliche Disulfidbrücken, die aus vier Cysteinen gebildet werden und der V-Domäne von TIM-3 eine zusätzliche Stabilität verleihen. Zudem führen sie zu der Bildung einer taschenähnlichen Struktur, die bisher bei keinem anderen Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie gezeigt werden konnte und vermutlich bei der Ligandenbindung eine Rolle spielt [214, 215]. Als wichtigster und bekanntester Ligand kommt für TIM-3 das 35 kDa große Zelloberflächenmolekül Galectin-9 in Frage, das zur Gruppe der S-Lektine, einer Familie von Kohlenhydrat bindenden Proteinen, denen eine wichtige Rolle bei der Regulation einer Inflammation und der Homöostase von Immunzellen nachgesagt wird, gehört

[209, 216]. Galectin-9 ist auf vielen verschiedenen Zellen zu finden und wird durch  $\text{IFN}\gamma$  hochreguliert [217]. Es werden weitere Liganden für TIM-3 vermutet, wie z.B. Phosphatidylserine oder Kohlenhydratketten, die jedoch noch nicht ausreichend untersucht sind [190, 218, 219]. Wie genau die Bindung von Galectin-9 an TIM-3 zur Ausführung seiner koinhibitorischen Funktion führt, ist bisher ebenfalls noch nicht vollständig untersucht. Belegt werden konnte jedoch bereits, dass TIM-3 kein klassisches ITIM Motiv besitzt, das für die Übertragung inhibitorischer Signale verantwortlich ist. Stattdessen weist TIM-3 ein intrazelluläres Tyrosinkinase-Phosphorylierungs-Motiv auf (siehe Abbildung 1.9) [220].



**Abbildung 1.9: Signalweg von TIM-3.**

Der genaue Mechanismus der Signalübertragung von TIM-3 ist noch nicht vollständig untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass TIM-3 an seinen Liganden Galectin-9 auf den APZ (DZ) bindet und seine inhibitorischen Signale über ein Tyrosinkinase-Phosphorylierungs-Motiv, bestehend aus fünf Tyrosinresten am zyttoplasmatischen Ende, vermittelt. Die Tyrosinreste (Y) werden nach der Bindung mit Galectin-9 phosphoryliert und führen so zu einer Unterbrechung des TZR Signalweges bzw. des kostimulatorischen Signals, wobei die Rekrutierung von SHP eine Rolle spielt.

Diese zyttoplasmatische Region ist bei TIM-3 in Maus und Mensch stark konserviert und enthält fünf Tyrosinreste, die bei der Signalübertragung von TIM-3 eine entscheidende Rolle spielen [221]. Nach der Bindung mit Galectin-9 werden die Tyrosinreste phosphoryliert, was nachfolgend zu einer Unterbrechung des TZR- bzw. des kostimulatorischen Signalweges führt [144, 221]. Wie auch bei den Signalwegen von CTLA-4 und PD-1 beschrieben, spielt dabei die Rekrutierung der Phosphatase SHP eine Rolle [144]. Wie genau dies zu der Inhibierung des TZR Signalweges führt, ist bisher nicht untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass die Ligation von TIM-3 mit seinen Liganden die Funktion der  $T_H1$  Zellen in der Maus und im Menschen inhibiert und somit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielt [190, 209, 222]. Interessanterweise führt die Interaktion von Galectin-9 und TIM-3 nicht immer zu einer Unterdrückung der Immunantwort.

So konnten Anderson *et al.* sowohl im Menschen als auch in Mäusen bereits einen gegenteiligen Effekt nachweisen, bei dem der Signalweg von Galectin-9/TIM-3 in DZ mit dem Toll-like Rezeptor-Signalweg synergisiert und so zu einer gesteigerten  $T_H1$  Immunität führte [208]. Auch eine Blockade von TIM-3 alleine, oder aber auch in Kombination mit anderen inhibitorischen Rezeptoren wie PD-1 oder LAG-3 (siehe in Kapitel 1.3.3.4) hat gezeigt, dass die T-Zellfunktion von zuvor erschöpften T-Zellen teilweise wiederhergestellt werden konnte [190]. So konnte bei Patienten mit HIV (Humanes Immundefizienzvirus) durch eine Blockade von TIM-3 eine Wiederherstellung der T-Zell-Proliferation, verbunden mit einer gesteigerten Zytokinexpression, erreicht werden [190, 211]. Eine kombinierte Blockade von TIM-3 mit PD-1 während der frühen Phase einer chronischen Retrovirus-Infektion (*Friend Virus*) führte zu einer Rückkehr der  $CD8^+$  T-Zell-Funktionalität und einer Verbesserung der Viruskontrolle [223]. Zu dem Einfluss von TIM-3 während einer *O. tsutsugamushi* Infektion liegen bisher keine Informationen vor.

### 1.3.3.4 LAG-3

Ein weiterer koinhibitorischer Rezeptor ist LAG-3 (CD223; engl. *Lymphocyte activation gene-3*), ein Zelloberflächenmolekül, das 1990 entdeckt wurde [224, 225]. LAG-3 ist homolog zu CD4 und weist auf Genebene eine 20 %ige Identität zu diesem auf [226]. Es gehört wie die anderen vorgestellten koinhibitorischen Rezeptoren zu der Immunglobulin-Superfamilie, besteht aus 470 Aminosäuren und zeichnet sich durch eine extrazelluläre, eine transmembrane sowie eine zytoplasmatische Region aus [224]. LAG-3 wird auf B-, NK- und T-Zellen exprimiert [227]. In diesem Zusammenhang zeigten Workman *et al.*, dass LAG-3 auf naiven  $CD8^+$  T-Zellen nur in geringen Mengen exprimiert wird, wohingegen eine Antigenstimulation zu einem Anstieg der LAG-3 Expression auf  $CD8^+$  T-Zellen führt [225]. Auf T-Zellen dient LAG-3 der negativen Regulation der T-Zell-Aktivierung sowie ihrer Homöostase [225, 228]. Als Ligand dient dem CD4 ähnlichen LAG-3 der MHC-II Komplex [224]. Wie genau das inhibitorische Signal von LAG-3 vermittelt wird, ist noch nicht detailliert geklärt. Da jedoch ein Fehlen von LAG-3 in LAG-3 defizienten Mäusen zu einem Anstieg der  $CD8^+$  T-Zell-Proliferation führte, konnte eine regulatorische Wirkung von LAG-3 auf die Aktivität der T-Zellen bestätigt werden [226]. Für die Regulation soll ein spezielles KIEELE Motiv, das am zytoplasmatischen Teil von LAG-3 lokalisiert ist, verantwortlich sein [141, 229]. Es ist jedoch relativ wenig bekannt, wie LAG-3 seine inhibitorischen Effekte über dieses KIEELE Motiv vermittelt [144]. Gezeigt werden konnte jedoch auch für LAG-3, dass eine Blockade des koinhibitorischen Rezeptors in Mäusen zu einer Wiederherstellung der Effektorfunktion von T-Zellen, verbunden mit einem verminderten Tumorstadium, führt [226]. Eine Blockade von LAG-3 in Kombination mit PD-L1 löste eine starke Verbesserung der T- und B-Zell Antworten während einer Infektion mit dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* aus, wodurch die Bekämpfung des Parasiten beschleunigt wurde [230]. Auch für LAG-3 gibt es derzeit keine Publikationen während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi*.



### 1.3.4 T-Zell-Gedächtnis (Memory)

Bisher wurde in dieser Arbeit nur von der Aktivierung von T-Zellen und der damit verbundenen Bildung der Effektor-T-Zellen sowie den Mechanismen zur Herunterregulation der Immunantwort berichtet. Tatsächlich werden bei jeder spezifischen Immunreaktion auch Gedächtniszellen (Memory-Zellen) gebildet, wobei es unterschiedliche Modelle zur Entstehung des immunologischen Gedächtnisses gibt, auf die jedoch nicht näher eingegangen wird [58, 65]. Memory-Zellen ermöglichen es dem Immunsystem, bei einer wiederholten Infektion mit einem gleichen Erreger schneller und effektiver zu wirken, so dass eine erneute Infektion verhindert werden kann oder zumindest in einer milderer Form durchlaufen wird [65]. Vor allem T-Zellen übernehmen im Immungedächtnis eine wichtige Rolle [231]. Innerhalb der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen unterscheidet man zwischen verschiedenen Subpopulationen, die aufgrund diverser Chemokinrezeptoren, Homing-Molekülen sowie ihrer Zytokinproduktion charakterisiert werden können [65]. Unabhängig von ihrem Subtyp zeichnen sich die Memory-T-Zellen durch eine gesteigerte Expression der Oberflächenmoleküle CD45RO (Tyrosin Phosphatase mit einer Rolle bei der TZR-Signalübertragung), CD127 (IL-7 Rezeptor), **CD44** (in Leukozytenadhäsion involviert) sowie einer verringerten Expression von CD25 (Untereinheit des IL-2R) aus [90].

Bei einer Subpopulation der T-Gedächtniszellen handelt es sich um die Effektor-Memory T-Zellen ( $T_{EM}$ ). Sie zirkulieren kontinuierlich zwischen dem Blut und den peripheren Geweben (z.B. Lunge). Da ihnen sowohl L-Selektin (**CD62L**) als auch das Chemokin CCR7 fehlt, die in der Regel für die Rekrutierung von T-Zellen zu den sekundären lymphatischen Organen sorgen, sind  $T_{EM}$  nicht im Lymphknoten zu finden. Kommt es zu einer erneuten Infektion, sind die  $T_{EM}$  schneller am Ort der Infektion und sorgen dafür, dass die Sekundärreaktion schneller anlaufen kann. Dafür sekretieren sie die Zytokine IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-5 [65, 232].

Eine weitere Subpopulation stellen die Zentralen Memory T-Zellen ( $T_{ZM}$ ) dar. Sie zeichnen sich, im Gegensatz zu den  $T_{EM}$ , durch eine Expression von CCR7 und CD62L aus. Des Weiteren produzieren sie IL-2, jedoch kein IFN $\gamma$  oder IL-4. Dies ermöglicht ihnen zwischen dem Blut und den peripheren lymphatischen Geweben, wie dem Lymphknoten, zu zirkulieren, um so bei einer Sekundärinfektion im Vergleich zu naiven T-Zellen schneller und sensibler auf das Antigen zu reagieren und mit einer schnellen Differenzierung in Effektor-T-Zellen zu antworten. Anschließend wandern die Zellen in die Gewebe ein, um dort den  $T_H1$  und  $T_H2$  Zellen helfen zu können [65, 232].

Auch während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* wird ein immunologisches Gedächtnis ausgebildet, jedoch liegt dieses zeitlich sehr begrenzt vor und bietet nicht immer auch gegen unterschiedliche Stämme einen Schutz. So sind bei *O. tsutsugamushi* Infektionen auch Superinfektionen, also einer aufgrund einer unvollständigen Immunität ermöglichten erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger, möglich [233, 234]. Es gibt jedoch auch Studien, die sich mit der Entwicklung möglicher Vakzine gegen *O. tsutsugamushi* beschäftigen. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Impfung von Mäusen mit zuvor durch Formalin abgetötete *Orientien* des Gilliam bzw. Karp Stammes einen vollständigen homologen Schutz, also gegen *Orientien* des gleichen Stammes, gewährleisten konnte [235].

Ein heterologer Schutz auch gegen andere Stämme von *O. tsutsugamushi* wurde jedoch nicht ausgebildet [235, 236].

## 1.4 IL-10 als anti-inflammatorisches Zytokin

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits diverse Mechanismen zur Regulation der Immunantwort beschrieben. Neben den Tregs und den koinhibitorischen Molekülen CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 gibt es auch Zytokine, die in die Regulation der Immunantwort involviert sind. So ist auch Interleukin 10 (IL-10) ein Zytokin mit einer anti-inflammatorischen Wirkung, das eine zentrale Rolle während einer Infektion übernimmt. Es begrenzt die Immunantwort auf Pathogene und beugt somit inflammatorischen und autoimmunen Schäden vor [137, 237–239]. Die Expression von IL-10 ist nicht, wie ursprünglich angenommen, spezifisch für  $T_H2$ - (engl. *T helper type 2*) oder Treg Zellen [237]. So wird IL-10 von vielen Zellen des adaptiven Immunsystems, wie  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$  Zellen sowie Treg,  $CD8^+$  und B-Zellen exprimiert [137, 239–243]. Aber auch Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. DZ, Makrophagen, Mastzellen, NK Zellen, Eosinophile und Neutrophile produzieren IL-10 [137]. IL-10 ist ein 35-40 kDa großes, nicht kovalentes Homodimer aus zwei sich gegenseitig durchdringenden Polypeptidketten, ähnlich wie  $IFN\gamma$  [244, 245]. Es bindet an seinen IL-10 Rezeptor (IL-10R), der aus mindestens zwei Untereinheiten, die wiederum Mitglieder der Interferon Rezeptor Familie sind, gebildet wird [137]. Eine Untereinheit wird dabei von IL-10R1 gebildet und ist für die Bindung des IL-10 zuständig, während die zweite Untereinheit IL-10R2 für die Signalübertragung verantwortlich ist [137].

Es wurde bereits beschrieben, dass IL-10 das Wachstum, die Differenzierung und zytotoxische Aktivität von  $CD8^+$  T-Zellen und NK-Zellen fördern kann [137, 246–248]. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass IL-10 *in vitro* die Differenzierung und das Wachstum von  $CD8^+$  Milzzellen in der Maus steigert [246]. Andererseits inhibiert IL-10 die  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  und IL-2 Synthese in  $T_H1$  Zellen [244, 249].

Genauso vielfältig wie das Expressionsverhalten von IL-10 auf den verschiedenen Zellen des Immunsystems sind auch die Auswirkungen von IL-10 bei der Regulation des Immunsystems. Ein Fehlen von IL-10 führt in IL-10 defizienten Mäusen zur Entwicklung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, so dass die Funktion von IL-10 als Regulator des Immunsystems bestätigt werden konnte [250]. Ein Fehlen von IL-10 führt allerdings nicht immer zu einer verstärkten Immunpathologie, sondern kann bei einigen Pathogenen (z.B. LCMV) zu ihrer besseren Bekämpfung beitragen [251, 252]. Bei anderen Pathogenen (z.B. *Plasmodium*; *Toxoplasma gondii*) hingegen hat ein Fehlen von IL-10 keinen Einfluss auf die Pathogenlast, sondern führt ausschließlich zu Schäden im Wirt [253, 254]. Die Daten lassen darauf schließen, dass ein Fehlen von IL-10 teilweise durch andere regulatorische Mechanismen kompensiert werden kann [237]. Interessanterweise konnten Mege *et al.* zeigen, dass IL-10 die Anfälligkeit des Wirtes für viele intrazelluläre Mikroorganismen erhöht und für die Persistenz von Bakterien, wie z.B. *M. tuberculosis*, verantwortlich ist [255]. Bei Meghari *et al.* dienen IL-10 überexprimierende Mäuse sogar als Modellorganis-

mus für eine persistierende Infektion mit dem intrazellulären Erreger *C. burnetii* [256]. Zudem konnte von Anderson *et al.* ein  $\text{IFN}\gamma$  IL-10 koproduzierender Zelltyp vorgestellt werden, der für die Pathogenese einer chronischen Infektion mit der kutanen Leishmaniose verantwortlich gemacht wurde [257].

Auch während einer *O. tsutsugamushi* Infektion scheint IL-10 sowohl in der Maus als auch im Menschen eine Rolle zu spielen. Kim *et al.* konnten zum Beispiel in der Maus eine verstärkte Sekretion von IL-10 in den Makrophagen nach einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* zeigen, was zudem zu einer Inhibierung der  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion führte [258]. Im Serum von Patienten mit dem Tsutsugamushi-Fieber konnten Kramme *et al.* ebenfalls einen Anstieg von IL-10 nachweisen [259]. Matthias Hauptmann konnte zudem eine Produktion von IL-10 von restimulierten Milz- und Lungenzellen während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* zeigen [77]. Auch in der peritonealen Flüssigkeit bei Mäusen lag IL-10 an den Tagen sechs bis acht nach der Infektion erhöht vor [260]. Das Gleiche galt für die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion, die zur gleichen Zeit erhöht war. Während einer *O. tsutsugamushi* Infektion scheinen demnach beide Zytokine, IL-10 und  $\text{IFN}\gamma$ , verstärkt produziert zu werden. Koh *et al.* vermuten in diesem Zusammenhang, dass die gleichzeitig gesteigerte Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  in Kombination mit IL-10 der Entwicklung eines klassischen  $\text{T}_H1/\text{T}_H2$  Zellprofils widerspricht. In diesem Zusammenhang gibt es Studien, die auch bei anderen intrazellulären Pathogenen bereits einen gleichzeitigen Anstieg von IL-10 und  $\text{IFN}\gamma$  beschrieben haben [261–263]. Ein Zytokinprofil, das ein hohes Level an IL-10 und  $\text{IFN}\gamma$  zeigt, wurde bereits für Zellen des  $\text{T}_R1$  Typs beschrieben. Dieser Zelltyp unterdrückt antigen-spezifische Immunantworten und reguliert eine pathologische Immunantwort [260, 264].

## 1.5 Zielsetzung und Hypothese der Arbeit

Eine Immunantwort hängt immer von einem Gleichgewicht zwischen Reaktionen, die einerseits eine Infektion kontrollieren, und auf der anderen Seite einer umgekehrten Antwort, die Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen vorbeugen, ab [111]. Die T-Zellen stellen hierbei dem Immunsystem einen Mechanismus bereit, bei dem sowohl kostimulatorische als auch koinhibitorische Moleküle im Zusammenspiel eine Feinabstimmung der Immunantwort ermöglichen [144]. In der Literatur wurde schon sehr viel über koinhibitorische Moleküle im Zusammenhang mit verschiedenen Pathogenen beschrieben. Informationen über die koinhibitorischen Moleküle während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* fehlen bisher jedoch völlig.

Im Zuge dieser Arbeit sollte nun erstmals der Einfluss der negativen T-Zell-Kostimulation auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort während einer *O. tsutsugamushi* Infektion in der Maus untersucht werden. Dabei sollten auch die Folgen der negativen Kostimulation für den Infektionsverlauf durch eine gezielte *in vivo* Blockade der Korezeptoren ermittelt werden. Aufgrund vorangegangener Studien diverser Arbeitsgruppen, in denen durch eine Blockade verschiedener negativer Korezeptoren eine gesteigerte T-Zell-Immunantwort mit einer gesteigerten Pathogenabwehr erreicht werden konnte, lag die Hypothese vor, dass

auch bei einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* die Effektorantwort verstärkt würde und sich so eine Verringerung der Bakterienlast erzielen ließe.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf der Untersuchung der vier koinhibitorischen Rezeptoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3. Der Einfluss dieser Korezeptoren sollte dabei während der akuten Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion, in der das *Priming* der T-Zellen stattfindet, mit ihrem Einfluss während der chronischen Phase der Infektion, die zugleich die Persistenzphase des Bakteriums darstellt, miteinander verglichen werden. Die Bedeutung der negativen Kostimulation für die T-Zell-vermittelte Immunantwort sollte dabei durch durchflusszytometrische Analysen ermittelt werden, während die Folgen einer negativen Kostimulation für die Bakterienlast mittels einer erregerspezifischen qPCR nachgewiesen werden sollten. Ziel war es dabei die Untersuchungen im Hauptorgan der *O. tsutsugamushi* Infektion, der Lunge, vorzunehmen.

## 2 Material

### 2.1 Laborgeräte

Für die Durchführung der Versuche dieser Arbeit wurden folgende in Tabelle 2.1 aufgeführten Geräte verwendet.

**Tabelle 2.1: Verwendete Laborgeräte**

Gerät	Hersteller
Accuri-C6	Becton Dickinson, Heidelberg
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav 6464L	Schlumbohm Medizintechnik, Hamburg
Beckmann-Zentrifuge J2-21	Gemini BV, Apeldoorn, Niederlande
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Digitalwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop, Axioskop 2 plus	Zeiss, Jena
Flüssigstickstoffbehälter	Air Liquide, Marne la Vallee, Frankreich
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubator Hera cell 150	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Kühl- und Gefrieranlagen	Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
Kühl- und Gefrieranlagen	Bosch, Gerlingen
Lichtmikroskop, invers	Hund, Wetzlar
Lightcycler 480 II	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
LSR-II	Becton Dickinson, Heidelberg
Megafuge 1.0 und 1.0R	Heraeus, Hanau
Nanodrop 2000c	Thermo Scientific, Waltham, USA
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Thermo Scientific, Waltham, USA
Precellys 24-Homogenisator	Peqlab, Erlangen
Rollinkubator Cell Roll	IBS Tecnomara, Fernwald
Sicherheits- und Sterilwerkbänke	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl
Thermomagnetrührer RET-GS	IKA <sup>®</sup> -Werke, Staufen
Vortexmischer	Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich
Vortexmischer	VWR, Darmstadt
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zählkammer Neubauer	Paul Marienfeld, Lauda Königshofen
Zentrifuge 3-16	Sigma-Aldrich, Osterode am Harz
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
$\gamma$ -Bestrahlungsgerät	STS, Braunschweig

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in der nachfolgenden Tabelle 2.2 aufgelistet.

**Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller
CELLMASTER <sup>TM</sup> Zellkultur-Rollerflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Dialysierschlauch (0,023 mm/34 mm)	Roth, Karlsruhe
Einmalskalpelle (steril)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen Injekt <sup>®</sup> (1 und 10 mL), steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
FACS Röhrchen (5 mL Polystyren)	Sarstedt, Nümbrecht
Falcons (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen, Biosphere, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen (18, 20 und 27 Gauge), steril	B. Braun Melsungen, Melsungen
Knopfkanüle (1428 LL)	Acufirm, Ernst Kratz, Dreieich
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Maskierte Objektträger, 12-Well	Thermo Scientific, Braunschweig
Objektträger (Mattrand)	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Petrischalen, 92 mm, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL), steril	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten (1 mL), steril	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsplatten (96-Well, 384-Well)	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Precellys-Röhrchen (1,4/2,8 mm)	Peqlab, Erlangen
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Schottflaschen	Schott, Mainz
Schottflaschen, LPS-frei	Schott, Mainz
Sterilfilter (0,22 µm und 0,45 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte 6-Well, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte 24-Well, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte 96-Well, U-Form	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsiebe, 70 µm, steril	BD Falcon, Heidelberg

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind nach ihren Einsatzgebieten zellbiologische Methoden (siehe Tabelle 2.3) und molekularbiologische Methoden (siehe Tabelle 2.4) aufgelistet. Abschließend sind die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper (siehe Tabellen 2.5, 2.6, 2.7 und 2.8) aufgeführt.

### 2.3.1 Chemikalien und Reagenzien für zellbiologische Methoden

**Tabelle 2.3: Chemikalien und Reagenzien für zellbiologische Methoden**

Reagenz	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Collagenase D (> 0,15 U/mg)	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
Cytofix/Cytoperm	eBioscience, Frankfurt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
DNase I (≥ 400 Kunitz U/mg)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
F <sub>C</sub> -Block	BNITM, Hamburg
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Foxp3 <i>Transcription Factor Staining Set</i>	eBioscience, Frankfurt
Gentamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Golgi Stop	BD Pharmingen, Heidelberg
HEPES	PAA, Linz, Österreich
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Ketamin (Ketavet)	Pharmacia, Berlin
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Methylzellulose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
OneComp eBeads	eBioscience, Frankfurt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS (10x), Gibco pH 7,4; steril	Life Technologies, Darmstadt
Perm-Wasch-Lösung	eBioscience, Frankfurt
PFHM II-serumfrei (engl. <i>protein-free hybridoma medium</i> )	Life Technologies, Karlsruhe
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RPMI 1640 Kulturmedium ohne L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
TBS (engl. <i>Tris-buffered Saline</i> )	Dianova, Hamburg
TMB Substrat (Tetramethylbenzidin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypsin	Thermofischer Scientific, Darmstadt
Tween 20	Serva, Heidelberg
Xylazin (Rompun)	Bayer, Leverkusen

### 2.3.2 Chemikalien und Reagenzien für molekularbiologische Methoden

**Tabelle 2.4: Chemikalien und Reagenzien für molekularbiologische Methoden**

Reagenz	Hersteller
10x Puffer für DNA Polymerase HotStar Taq	Qiagen, Hilden
Ampullenwasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP-Mix)	Applied Biosciences, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA Polymerase HotStarTaq	Qiagen, Hilden
LEGENDplex <sup>TM</sup> Multi-Analyte Flow Assay Kit	Biolegend, London, UK
QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini Extraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAGEN <sup>TM</sup> Elutionspuffer	Qiagen, Hilden
Sybr Green I	Invitrogen, Darmstadt

### 2.3.3 Antikörper

In Tabelle 2.5 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper ( $\alpha$ -) für durchflusszytometrische Analysen aufgeführt.

**Tabelle 2.5: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen**

Antikörper	Klon	Verdünnung	Hersteller
$\alpha$ -CD4-APC-Cy7	RM4-5	1:200	BD, Heidelberg
$\alpha$ -CD4-V500	RM4-5	1:200	BD, Heidelberg
$\alpha$ -CD8-PerCP-Cy5.5	53-6.7	1:100	BD, Heidelberg
$\alpha$ -CD8a-FITC	53-6.7	1:200	Biolegend, London, UK
$\alpha$ -CD11a-Pe-Cy7	M17/4	1:200	Biolegend, London, UK
$\alpha$ -CD44-BV510	IM7	1:100	Biolegend, London, UK
$\alpha$ -CD62L-PE-Cy7	MEL-14	1:100	eBioscience, Frankfurt
$\alpha$ -CTLA-4-BV421	UC10-4B9	1:100	Biolegend, London, UK
$\alpha$ -Foxp3-Alexa Fluor 700	FJK-165	1:80	eBioscience, Frankfurt
$\alpha$ -GranzymB-PE	GB12	1:50	Invitrogen, Darmstadt
$\alpha$ -IFN $\gamma$ -FITC	XMG1.2	1:100	BD, Heidelberg
$\alpha$ -IL-2-PE	JES6-5H4	1:100	Biolegend, London, UK
$\alpha$ -IL-10-Alexa Fluor 700	JES5-16E3	1:100	eBioscience, Frankfurt
$\alpha$ -KLRG1-FITC	2F1/KLRG1	1:200	Biolegend, London, UK
$\alpha$ -LAG-3-PerCP-Cy5.5	C9B7W	1:200	Biolegend, London, UK
$\alpha$ -PD-1-efluor450	RMP1-30	1:100	eBioscience, Frankfurt
$\alpha$ -PD-1-PE	RMP1-30	1:100	Biolegend, London, UK
$\alpha$ -TIM-3-APC	RMT3-23	1:400	Biolegend, London, UK
$\alpha$ -TNF $\alpha$ -APC	MP6-XT22	1:100	BD, Heidelberg

Folgender Antikörper wurde für *in vitro* Restimulationen von Milzzellen eingesetzt (siehe Tabelle 2.6).



**Tabelle 2.6: Antikörper für *in vitro* Analysen**

Antikörper	Klon	Konzentration	Hersteller
$\alpha$ -CD3	145-2C11	1 $\mu$ g/mL	Biologend, London, UK

Für die *in vivo* Behandlungen der Mäuse im Rahmen der Blockade-Experimente wurden nachfolgende Antikörper eingesetzt (siehe Tabelle 2.7). Der Antikörper gegen CTLA-4 wurde zuvor mit Hilfe des Hybridoms 4F10 für diese Arbeit selbst hergestellt.

**Tabelle 2.7: Antikörper für *in vivo* Behandlungen**

Antikörper	Klon	Applikationsmenge	Hersteller
$\alpha$ -CTLA-4	4F10	400 $\mu$ g	Stefanie Lilla, BNITM, Hamburg
$\alpha$ -LAG-3	C9B7W	100 $\mu$ g	BioXCell, West Lebanon, USA
$\alpha$ -PD-1	RPM1-14	250 $\mu$ g	BioXCell, West Lebanon, USA
$\alpha$ -TIM-3	RMT3-23	200 $\mu$ g	BioXCell, West Lebanon, USA

Die Immunfluoreszenzfärbungen zur Kontrolle der infizierten Inokulate wurden mit Hilfe der in Tabelle 2.8 aufgelisteten Antikörper durchgeführt.

**Tabelle 2.8: Antikörper für Immunfluoreszenz**

Antikörper	Klon	Verdünnung	Hersteller
Maus- $\alpha$ -56 kDa ( <i>O. tsutsugamushi</i> )	2F2	1:2000	BNITM, Hamburg
Ziege- $\alpha$ -Maus IgG DyLight 488	polyklonal	1:500	Dianova, Hamburg
Ziege- $\alpha$ -Maus IgG Peroxidase	polyklonal	1:2000	Dianova, Hamburg

## 2.4 Bakterienstämme, Hybridom, Zelllinien, Mausstämme

Für die Anzucht von *O. tsutsugamushi* in dieser Arbeit wurde auf folgende Zelllinie (siehe Tabelle 2.9) zurückgegriffen.

**Tabelle 2.9: Zelllinien**

Zelllinie	Herkunft
L929-Mausfibroblasten	DSMZ, Braunschweig

Der  $\alpha$ -CTLA-4 Antikörper für die *in vivo* Behandlungen wurde aus dem Überstand einer Zellkultur mit dem Hybridom 4F10 (siehe Tabelle 2.10) aufgereinigt.

**Tabelle 2.10: Hybridom**

Hybridom	Klon	Herkunft
$\alpha$ -CTLA-4 Hybridom	4F10	Christiane Steeg, BNITM, Hamburg

Für die Infektionen dieser Arbeit wurde folgender Bakterienstamm eingesetzt (siehe Tabelle 2.11).

**Tabelle 2.11: Bakterienstamm**

Bakterienstamm	Herkunft
<i>Orientia tsutsugamushi</i> Karp	Dr. J. Stenos, Division of Veterinary and Biomedical Science, Murdoch University, Murdoch, Australien

Alle Tierversuche dieser Arbeit wurden mit nachfolgendem Mausstamm durchgeführt (siehe Tabelle 2.12).

**Tabelle 2.12: Mausstamm**

Mausstamm	Herkunft
C57BL/6J	Charles River, Sulzfeld

## 2.5 Kulturmedien, Puffer, Stammlösungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf diverse Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen zurückgegriffen. Die Zusammensetzung der Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen für die zellbiologischen und tierexperimentellen Arbeiten sind in Tabelle 2.13 und für die molekularbiologischen Arbeiten in Tabelle 2.14 zu finden.

### 2.5.1 Kulturmedien, Puffer, Stammlösungen für zellbiologische und tierexperimentelle Arbeiten

**Tabelle 2.13:** Kulturmedien, Puffer, Stammlösungen für zellbiologische und tierexperimentelle Arbeiten

Medium, Puffer, Stammlösung	Zusammensetzung	pH
Blockpuffer	400 mL TBS-Tween 20 g Milchpulver	
Collagenase/DNAse Lösung	1:100 Collagenase-Stammlösung 10 µg/mL DNAse I in R5F <sup>-G</sup> (siehe unter R in dieser Tabelle)	
Collagenase-Stammlösung	20 mg/mL Collagenase	
Erythrozytenlysepuffer	10 % 0,17 M TRIS 90 % 0,17 M NH <sub>4</sub> Cl	7,4
FACS Puffer	1 % FCS 0,01 % NaN <sub>3</sub> in PBS	
Ketamin/Xylacin-Lösung	12 mg/mL Ketamin 1,6 mg/mL Xylacin in PBS	
Kryomedium	60 % FCS 40 % DMSO	
Methylzellulose-Lösung	16,8 g Methylzellulose in 600 mL Wasser	
Methylzellulose-Medium	33 % Methylzellulose-Lösung 67 % R10F <sup>-G</sup> (siehe unter R in dieser Tab.)	
Paraformaldehyd-Lösung	4 % Paraformaldehyd	
PBS (10x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,4

		Material
Medium, Puffer, Stammlösung	Zusammensetzung	pH
PFHM serumfrei	500 mL PFHM-Medium 10 mL L-Glutamin (200 mM)	
Phosphatpuffer	Stock 1: 500 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O Stock 2: 500 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O Stock 1 und 2 auf 20 mM verdünnen	7,0
R5F <sup>-G</sup>	500 mL RPMI 1640-Medium ohne Glutamin 50 mL FCS 10 mL HEPES (1 M) 10 mL L-Glutamin (200 mM)	
R5F <sup>+G</sup>	wie R5F <sup>-G</sup> aber plus 2,5 mL Gentamycin (10 mg/mL)	
R10F <sup>-G</sup>	wie R5F <sup>-G</sup> aber 100 mL FCS	
TBS (10x)	24,2 g Tris-Base 80 g NaCl ad 1 L <i>Aq. bidest.</i>	7,6
TBS-Tween	10 % TBS (10x) 0,1 % Tween 20	8,5
Trypanblau-Lösung	2 % Trypanblau (50x) in PBS	

### 2.5.2 Kulturmedien, Puffer, Stammlösungen für molekularbiologische Arbeiten

**Tabelle 2.14: Kulturmedien, Puffer, Stammlösungen für molekularbiologische Arbeiten**

Medium, Puffer, Stammlösung	Zusammensetzung
Sybr Green Lösung	1:1000 Sybr Green 1 in DMSO

---

## 2.6 Nukleinsäuren

**Tabelle 2.15: Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
traD-fw (3b)	CACAACATCCAAATGTTTCAG	TIB Molbiol, Berlin
traD-rv (6a)	GCACCATTCTTGACGAAA	TIB Molbiol, Berlin

---

## 2.7 Software

**Tabelle 2.16: Software**

Software	Hersteller
GraphPad Prism Version 5.0b	GraphPad Software, La Jolla, USA
FlowJo 10.06	Treestar, Ashland, USA
LEGENDplex <sup>TM</sup> Version 7.0	Biolegend, Heidelberg

---

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden bei sterilen Bedingungen unter der Verwendung steriler Verbrauchsmaterialien und einer sterilen Sicherheitsbank der Klasse II durchgeführt. Bei den Methoden der Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 3.1.9) und der Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 3.1.4) war dies nicht notwendig. Die Zentrifugationsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, für 5 min bei 322x g und einer Temperatur von 4 °C durchgeführt.

#### 3.1.1 Bestimmung von Zellzahlen

Für einen Großteil der zellbiologischen Arbeiten muss die Konzentration der Zellen mittels Neubauer Zählkammer bestimmt werden. Dafür wurden 10 µL Zellsuspension in 90 µL Trypanblau verdünnt. Milzzellen wurden aufgrund ihrer erhöhten Zellkonzentration ein weiteres Mal 1:10 verdünnt. Anschließend folgte die Auszählung der lebenden, farblosen Zellen unter einem inversen Lichtmikroskop. Dabei wurden jeweils zwei Großquadrate der Neubauer Zählkammer ausgezählt und der Mittelwert der gezählten Zellen für die Berechnung der Zellkonzentration verwendet. Die Konzentration der Zellen konnte mit folgender Formel unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors und des Kammerfaktors  $10^4$  ermittelt werden:

$$\text{Zellkonzentration pro 1 mL} = \text{Anzahl an gezählten Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

#### 3.1.2 Kultivierung von L929 Zellen

L929 Zellen wurden regelmäßig in Kultur gehalten. Die Zellen wurden dabei bei 37 °C und einer 5 % CO<sub>2</sub> Sättigung in R5F<sup>+G</sup> kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und jeweils 4x10<sup>6</sup> Zellen auf neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verteilt. Die kultivierten Zellen wurden zur Herstellung von infizierten und nicht infizierten L929 Inokulaten für nachfolgende *in vivo* Infektionen benötigt.

#### 3.1.3 Herstellung von infizierten und nicht infizierten L929 Inokulaten

Für die Herstellung *O. tsutsugamushi* infizierter Inokulate wurden die L929 Zellen einen Tag vor der Infektion mit etwa 2000 rad  $\gamma$ -Strahlen für 540 s bestrahlt und in R5F<sup>-G</sup> aufgenommen. Wichtig für alle Arbeiten mit infizierten Zellkulturproben ist das Verwenden eines Mediums ohne Gentamycin (R5F<sup>-G</sup>), um das Wachstum der Bakterien nicht

zu hemmen. Für die Infektion wurde zunächst ein kryokonserviertes *O. tsutsugamushi* Inokulat zügig in der Hand aufgetaut und in ein 15 mL Falcon überführt. Insgesamt wurden 10 mL R5F<sup>-G</sup> tröpfchenweise hinzugegeben und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 6 mL R5F<sup>-G</sup> aufgenommen und auf einen nicht infizierten L929-Zell-Monolayer in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C sowie nach 3 d erfolgte ein Mediumwechsel mit 15 mL frischem R5F<sup>-G</sup>. Nach weiteren 4 d wurde eine neue 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit *O. tsutsugamushi* infiziert. Eine bzw. zwei Wochen nach den Infektionen wurden acht große 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit bestrahlten L929 Zellen mit jeweils 1 mL eines gepoolten Inokulates aus den ein bzw. zwei Wochen alten infizierten Zellen behandelt. Die Ernte der infizierten Inokulate erfolgte nach einer weiteren Woche. Nach dem Abschaben der Zellen wurden diese inklusive Überstand aller acht Flaschen gepoolt und bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 28 mL R5F<sup>-G</sup> aufgenommen und à 0,5 mL auf Kryoröhrchen aufgeteilt und zusammen mit weiteren 0,5 mL Kryomedium in flüssigem Stickstoff eingefroren.

In den *in vivo* Experimenten dieser Arbeit wurden zudem nicht infizierte Kontrollgruppen benötigt. Diese erhielten anstelle der infizierten Inokulate nicht infizierte L929 Inokulate. Dazu wurden nicht infizierte Zellen inklusive Überstand von acht großen 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gepoolt und ebenfalls in Kryoröhrchen im Verhältnis 1:1 mit Kryomedium eingefroren. Um den Erfolg der einzelnen Infektionsschritte zu überprüfen, wurden von den jeweiligen Inokulaten Immunfluoreszenzfärbungen (siehe Kapitel 3.1.4) angefertigt.

### 3.1.4 Immunfluoreszenz zum Nachweis von *O. tsutsugamushi*

Zur Überprüfung, ob ein Inokulat wirklich mit *O. tsutsugamushi* infiziert war, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurde 1 mL eines Inokulates noch vor der Zugabe des Kryomediums im Rahmen der Herstellung von infizierten Inokulaten (siehe Kapitel 3.1.3) zunächst für 5 min bei 15871x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µL PBS resuspendiert und bei 56 °C für 30 min inaktiviert. 20 µL des Inokulates wurden auf einen maskierten Objektträger aufgetragen. Nach 1 h Trockenzeit folgte eine Fixierung für 10 min bei -20 °C in Aceton. Die Färbung erfolgte durch eine 30 min Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer mit 20 µL des gegen das 56 kDa Oberflächenprotein von *O. tsutsugamushi* gerichteten Antikörpers (Klon 2F2) bei einer Verdünnung von 1:2000 in PBS. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS und eine Inkubation mit 20 µL DyLight α-Maus IgG (1:500 in PBS). Nach erneutem dreimaligem Waschen konnte das Inokulat unter dem Fluoreszenzmikroskop auf eine positive Färbung des Antikörpers gegen das 56 kDa gerichteten Oberflächenprotein und somit auf *O. tsutsugamushi* hin überprüft werden. Nach erfolgreicher Färbung konnten die hergestellten Inokulate (siehe Kapitel 3.1.3) für Experimente weiterverwendet werden.

### 3.1.5 Immunofocus-Assay zur Quantifizierung von infizierten Inokulaten

Um die Infektiosität der hergestellten infizierten Inokulate *in vitro* quantifizieren zu können, sowie mehrere zu verschiedenen Zeitpunkten hergestellte Inokulate miteinander vergleichen zu können, wurde ein *Immunofocus*-Assay herangezogen [30]. In eine 24-Well

Platte wurden pro *Well* jeweils  $4 \times 10^5$  zuvor mit etwa 2000 rad  $\gamma$ -bestrahlte Zellen für 540 s in 1 mL R5F<sup>-G</sup> ausgesät und über Nacht kultiviert. Daraufhin wurde ein Kryoröhrchen eines bereits kryokonservierten infizierten Inokulates zügig aufgetaut, mit R5F<sup>-G</sup> gewaschen und bei 9371x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL R5F<sup>-G</sup> resuspendiert, wovon anschließend 50  $\mu$ L der Suspension auf 10 mL mit R5F<sup>-G</sup> aufgefüllt wurden. Nachdem von der Bakteriensuspension serielle 1:4 Verdünnungen hergestellt wurden, wurde das Medium von den 24- *Well* Platten abgenommen. Anschließend wurden pro *Well* 200  $\mu$ L R5F<sup>-G</sup> und jeweils 200  $\mu$ L der entsprechenden Inokulatverdünnungen hinzugegeben. Zur Sicherstellung, dass alle Bakterien des Inokulates auf den Boden der Zellkulturplatte gelangen, folgte eine Zentrifugation von 30 min bei 143x g, woraufhin der Überstand entfernt wurde und ein zweimaliges Waschen mit R5F<sup>-G</sup> durchgeführt wurde. Die infizierten Zellen wurden nun für 14 d in Methylzellulosemedium kultiviert, um eine Ausbreitung der Orientien nach dem *budding* (siehe Kapitel 1.1.2) zu verhindern. Daraufhin wurde das Medium entfernt, mit PBS gewaschen und 2 h mit 4 % Paraformaldehydlösung fixiert. Zur Detektion der gebildeten infizierten Bakterienkolonien (*Spots*) wurden die Zellen zunächst für 30 min mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Nach dem Waschen mit PBS und einer 1 h Inkubation in Blockpuffer zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des Antikörpers, folgte die Zugabe des  $\alpha$ -56 kDa Antikörpers für 1 h (1:2000 in PBS). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde für 1 h mit einem Peroxidase-konjugierten  $\alpha$ -Maus Antikörper (1:2000 in PBS) gefärbt. Es folgte ein erneutes zweimaliges Waschen mit PBS und eine Inkubation mit TMB Substrat. Sobald blaue *Spots* sichtbar wurden, konnte die Reaktion durch zweimaliges Waschen mit *Aq. bidest.* gestoppt werden. Die Auszählung der *Spots* pro *Well* erfolgte unter einem inversen Mikroskop. Zur Bestimmung der Infektiosität wurden die gezählten *Spots* gegen die jeweilige Verdünnung des Inokulates aufgetragen. Nach einer nicht linearen Regression konnte den hergestellten infizierten Inokulaten entsprechend der Anzahl an gezählten *Spots* eine entsprechende Infektionseinheit zugeordnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Mäuse mit einer Dosis von 25.000 *spot forming units* (*sfu*) infiziert.

### 3.1.6 Präparation von murinen Lymphozyten aus der Milz

Nach der Entnahme der Milz aus der Maus wurde diese zwischen zwei sterilen Objektträgern mit einem Mattrand zerrieben und in 4 mL R5F<sup>-G</sup> gegeben. Die Zell-Medium-Suspension wurde zentrifugiert, woraufhin die Erythrozyten durch Inkubation mit einem Erythrozytenlysepuffer für 5-7 min bei RT lysiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit R5F<sup>-G</sup> wurde das Pellet in R5F<sup>-G</sup> resuspendiert und die Zellzahl (siehe Kapitel 3.1.1) bestimmt. Die Milzzellen konnten anschließend für durchflusszytometrische Analysen oder *in vitro* Restimulationen eingesetzt werden.

### 3.1.7 Präparation von murinen Lymphozyten aus der Lunge

Vor der Entnahme der Lunge wurde zunächst eine Lungenperfusion (siehe Kapitel 3.3.3) durchgeführt, um die intravaskulären Leukozyten der Lunge, einem der am stärksten vaskularisierten Organe, zu entfernen. Anschließend wurde die Lunge mit einem sterilen



Skalpell in einer sterilen Petrischale sehr fein zerkleinert. Es folgte ein Verdau in 3 mL Collagenase/DNase Lösung im Wasserbad bei 37 °C für 60 min, wobei mit Hilfe einer Pasteurpipette alle 15 min auf- und abpipettiert wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 150 µL einer 5 mM EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C abgestoppt und der Gesamtverdau durch ein 70 µm Zellsieb gegeben. Nach einer Zentrifugation folgte eine Lyse der Erythrozyten durch Inkubation mit einem Erythrozytenlysepuffer für 2 min bei RT. Die Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit R5F<sup>-G</sup> zentrifugiert und in R5F<sup>-G</sup> resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.1.1) und die Zellen konnten für durchflusszytometrische Analysen oder *in vitro* Restimulationen eingesetzt werden.

### 3.1.8 Restimulation von murinen Zellen *in vitro*

Zur Messung intrazellulärer Zytokine, musste für einige Experimente eine *in vitro* Restimulation der zuvor isolierten Lungen- oder Milzzellen durchgeführt werden. So mussten für die LEGENDplex<sup>TM</sup>-Analysen (siehe Kapitel 3.1.10) in dieser Arbeit isolierte Milzzellen zunächst *in vitro* mit  $\alpha$ -CD3 restimuliert werden, um die Milzzellen bei der Zytokinproduktion zu unterstützen. Dazu wurden 2x10<sup>5</sup> Zellen pro *Well* jeweils in Triplikaten in einer 96-*Well* Rundbodenplatte für 48 h mit 1 µg/mL  $\alpha$ -CD3 (Klon: 145-2C11) in R5F<sup>+G</sup> bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Sättigung inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und bei -20 °C bis zur LEGENDplex<sup>TM</sup>-Analyse gelagert. Für geplante durchflusszytometrische Analysen (siehe Kapitel 3.1.9) von Zytokinen wurden hingegen jeweils 1x10<sup>6</sup> Lungenzellen pro *Well* in eine 96-*Well* Rundbodenplatte ausgesät und für 4 h mit 100 µL PMA (10 ng/mL), Ionomycin (250 ng/mL) sowie Golgi Stop (1:200) in R5F<sup>-G</sup> bei 37 °C und einer 5 % CO<sub>2</sub> Sättigung kultiviert, um die Zellen ebenfalls zur Zytokinproduktion anzuregen. Die restimulierten Zellen konnten anschließend für durchflusszytometrische Analysen gefärbt werden (siehe Kapitel 3.1.9).

### 3.1.9 Durchflusszytometrische Analyse

Für eine durchflusszytometrische Analyse wurden die isolierten und je nach Experiment zuvor restimulierten Zellen (siehe Kapitel 3.1.8) zunächst mittels fluoreszierenden Antikörpern für die gewünschten Marker (siehe Tabelle 2.5) gefärbt, um mit Hilfe von FACS (engl. *fluorescent activated cell sorting*) die jeweiligen Marker detektieren zu können. Dazu wurden jeweils 1x10<sup>6</sup> Zellen pro *Well* in eine 96-*Well* Rundbodenplatte ausgesät und nach der Zugabe von 150 µL FACS-Puffer zentrifugiert und der Überstand verworfen (Waschschritt). Anschließend folgte ein Oberflächenblock für 10 min bei 4 °C durch die Zugabe von 25 µL F<sub>C</sub>-Block, um unspezifische Bindungen der Antikörper an F<sub>C</sub>-Rezeptoren zu verhindern. Für die Oberflächenfärbung wurde mit 50 µL einer gewünschten Antikörperverdünnung in F<sub>C</sub>-Block für 60 min bei 4 °C inkubiert (siehe Abbildung 3.1).

		Färbeschema für...					
		Regulatoren		Aktivierungsmarker		Zytokine	
Extrazelluläre Färbung	CD8	FITC	CD8	PerCpCy5.5	CD8	PerCpCy5.5	
	CD4	V500	KLRG1	FITC	CD4	V500	
Intrazelluläre Färbung	PD-1	PE	CD62L	PE-Cy7	PD-1	PerCpCy5.5	
	LAG-3	PerCpCy5.5	PD-1	APC	CD4	efluor540	
	CD11a	PE-Cy7	CD44	V500			
	TIM-3	APC					
	CTLA-4	BV421	GrzB	PE	CD4	V500	
	Foxp3	AlexaFl.700			IFN $\gamma$	FITC	
					IL-2	PE	
					TNF $\alpha$	APC	
					IL-10	AlexaFl.700	

**Abbildung 3.1: Extra- und intrazelluläre Färbeschema für durchflusszytometrische Analysen.**

Dargestellt sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Protokolle zur Färbung von Regulatoren, Aktivierungsmarkern und Zytokinen.

Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer mussten die Zellen durch die Zugabe von 150  $\mu$ L Cytofix/Cytoperm für 20 min bei 4 °C permeabilisiert werden. Nach zweimaligem Waschen mit 150  $\mu$ L Perm-Wasch-Puffer wurden intrazelluläre Marker durch die Zugabe von 50  $\mu$ L einer Antikörperverdünnung in Perm-Wasch-Puffer für 30 min bei 4 °C gefärbt (siehe Tabelle 3.1). Die Zellen wurden mit Perm-Wasch-Puffer gewaschen und in FACS-Röhrchen mit 200  $\mu$ L FACS-Puffer resuspendiert. Die Messungen konnten daraufhin am LSR-II Durchflusszytometer erfolgen, wobei aufgrund der Fixierung mit Cytofix/Cytoperm zwischen der Färbung und der Messung nicht länger als 24 h liegen sollten, da sich einige Antikörper nicht gut fixieren lassen. Auf eine Fixierung kann allerdings nicht verzichtet werden, da einerseits der Cytofix/Cytoperm Puffer vor einer intrazellulären Färbung zur Permeabilisierung der Zellen benötigt wird. Andererseits werden die Bakterien durch die Fixierung deaktiviert, um eine Messung am LSR-II außerhalb der BSL3 (engl. *biosafety level 3*) Bedingungen zu ermöglichen. Vor den Messungen wurde eine Kompensation mit Hilfe von OneComp eBeads von eBioscience entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt, um Überschneidungen der Fluorochrome zu verhindern. Bei den Analysen wurden jeweils nicht stimulierte und FMO-Kontrollen (engl. *fluorescent minus one*) mitgeführt, um bei der Auswertung die Populationen entsprechend voneinander abgrenzen zu können.

### 3.1.10 Bead-basierender Immunassay zur Quantifizierung von Zytokinen - LEGENDplex<sup>TM</sup>

Zur Messung der IL-10 Zytokinkonzentration in den Überständen von isolierten und mit  $\alpha$ -CD3 restimulierten Milzzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein LEGENDplex<sup>TM</sup>-Assay durchgeführt, der auf dem Prinzip eines Sandwich-Immunassays basiert. Der Vorteil gegenüber ELISA ist zum einen eine parallele Messung von 13 verschiedenen Analyten in einem Assay. Des Weiteren besitzt er eine höhere Sensitivität. In dem Assay werden Beads eingesetzt, die nach ihrer Größe und interner Fluoreszenzintensität sortiert werden. Jede Beadsorte ist dabei mit einem spezifischen Antikörper gegen einen bestimmten zu

messenden Analyten auf seiner Oberfläche konjugiert. Die Analyten in den zu messenden Proben binden dann an ihre jeweilige für sie spezifische Beadsorte. Im Rahmen des Assays wird eine Mischung aus biotinylierten Detektionsantikörpern hinzugegeben, wobei jeder Detektionsantikörper an seinen spezifischen Analyten bindet, der wiederum zuvor an seinen spezifischen Bead gebunden hat. Es wurde demnach ein Sandwich aus Bead, Analyt und Detektionsantikörper gebildet, zu dem daraufhin Streptavidin-Phycoerythrin gegeben wird. Dieses bindet an den biotinylierten Detektionsantikörper und führt zu fluoreszierenden Signalen, die proportional zu der Menge an gebundenen Analyten sind. Zur Durchführung des Assays mussten zunächst die zu messenden Proben auf Raumtemperatur erwärmt werden. Pro *Well* einer 96-*Well* Rundbodenplatte wurden 25  $\mu\text{L}$  des mitgelieferten Assaypuffers und 25  $\mu\text{L}$  der zu messenden Proben pipetiert. In spezielle dafür vorgesehene *Wells* wurden anstelle der Proben 25  $\mu\text{L}$  eines mitgelieferten Standards gegeben. Die Proben wurden jeweils in Duplikaten aufgetragen. Im Anschluss wurden weitere 25  $\mu\text{L}$  der Beadlösung und 25  $\mu\text{L}$  der Detektionsantikörper den *Wells* beigelegt. Der Reaktionsansatz wurde vor Lichteinstrahlung geschützt und bei 600 rpm für 2 h auf einem Schüttler inkubiert. Es folgte die Zugabe von 25  $\mu\text{L}$  Streptavidin-Phycoerythrin und eine weitere Inkubationszeit von 30 min bei 600 rpm im Dunkeln. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 1000x g wurde der Überstand entfernt und mit 200  $\mu\text{L}$  des mitgelieferten Waschpuffers gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation von 5 min bei 1000x g wurden die Beads in 300  $\mu\text{L}$  des Waschpuffers resuspendiert, die Suspension in FACS Röhrchen überführt und die fluoreszierenden Signale am Accuri-C6 gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der speziell von Biolegend für die Auswertung bereitgestellte Software LEGENDplex<sup>TM</sup> Version 7.0.

### 3.1.11 Herstellung von $\alpha$ -CTLA-4 (Klon 4F10) für *in vivo* Applikationen

Der CTLA-4 Antikörper, der im Rahmen dieser Arbeit für *in vivo* Injektionen der Blockadeexperimente genutzt wurde, wurde mit Hilfe eines Hybridoms des Klons 4F10 selbst hergestellt. Zunächst wurde dazu ein kryokonserviertes Hybridom aufgetaut und zusammen mit 9 mL R5F<sup>-G</sup> in ein 15 mL Falcon gegeben. Nach einer Zentrifugation von 6 min bei 322x g wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 2 mL R5F<sup>-G</sup> resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wurde anschließend in ein *Well* einer 6-*Well* Platte überführt und bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Sättigung von 5 % über Nacht kultiviert. Am d1 wurden die Zellen in einem neuen *Well* mit R5F<sup>-G</sup> 1:5 verdünnt. Am d5 nach dem Auftauen wurde das Medium der Zellen abgenommen und durch serumfreies Medium (PFHM inkl. Glutamin) ersetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die gesamten Zellen zusammen mit 15 mL des serumfreien Mediums in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Sättigung von 5 % kultiviert bis sich das Medium gelb färbte und somit auf eine ausreichende Dichte an Zellen geschlossen werden konnte. Die gesamte Zellsuspension wurde anschließend in eine CELLMASTER<sup>TM</sup> Zellkultur-Rollerflasche gegeben und auf 300 mL mit serumfreiem Medium aufgefüllt. Die Kultivierung erfolgte waagrecht im Brutschrank bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Sättigung von 5 %. Nach einem Tag wurde die Zellkultur-Rollerflasche auf einen Rollinkubator ohne CO<sub>2</sub>-Sättigung plaziert und dort in

Bewegung gehalten bis nur noch etwa 70 % der Zellen vital waren, was etwa nach 7 d der Fall war. Ab diesem Zeitpunkt konnte die Aufreinigung des produzierten Antikörpers beginnen. Dazu wurde die Zellsuspension auf 50 mL Falcons aufgeteilt und bei 3578x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in eine LPS-freie und sterile Schottflasche überführt. Durch die schrittweise Zugabe von 390 g Ammoniumsulfat pro Liter Überstand, erfolgte eine Ammoniumsulfatfällung der Proteine über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rühren. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000x g für 20 min und anschließender Trocknung des Pellets. Daraufhin wurde das Pellet in 20 mM Phosphatpuffer (siehe Tabelle 2.13) aufgenommen (15 mL pro Pellet aus einem Liter serumfreiem Medium). Durch eine Dialyse wurde schließlich das Ammoniumsulfat gegen PBS entfernt. Der Dialysierschlauch wurde dafür zuvor für 20 min in *Aq. bidest.* eingeweicht und gespült. Das resuspendierte Pellet wurde in den Dialysierschlauch überführt und unter ständigem Rühren in einem Becherglas mit 500 mL PBS bei 4 °C über Nacht dialysiert. Es folgten zwei Pufferwechsel nach jeweils 24 h. Der aufgereinigte Antikörper wurde sterilfiltriert und nach einer Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop auf eine Konzentration von 2 mg/mL in PBS eingestellt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 DNA-Aufreinigung von Organproben

Damit die Bakterienlast in den verschiedenen Organen bestimmt werden konnte, musste zunächst die DNA aus den Organproben aufgereinigt werden. Dafür wurden etwa erbsengroße Stücke von Milz, Lunge, Leber, Gehirn und Herz bzw. der gesamte popliteale Lymphknoten in ein Precellys-Röhrchen, gefüllt mit Keramikkügelchen (1,4/2,8 mm) und 500 µL PBS, gegeben. Die mechanische Homogenisierung erfolgte mit Hilfe des Precellys 24-Homogenisators durch einen zweimaligen Programmdurchlauf von 6000 rpm für jeweils 45 s, unterbrochen von einer zweiminütigen Pause. Anschließend wurden zu 80 µL der Organsuspension 20 µL ProteinaseK, sowie 100 µL ATL Puffer aus dem QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Extraktionskit der Firma QIAGEN gegeben, worauf eine Inkubation bei 56 °C über Nacht folgte. Daraufhin wurden weitere 200 µL AL Puffer hinzugegeben und die Proben für 10 min bei 70 °C inkubiert. Die DNA Extraktion erfolgte entsprechend der Vorgaben des QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Extraktionskits, wobei folgende Änderungen zu berücksichtigen waren. Zuvor bei -20 °C gelagerte unaufgereinigte DNA Proben wurden zunächst für 5 min auf 37 °C erhitzt. Des Weiteren wurde die DNA am Ende in 50 µL QIAGEN<sup>TM</sup> Elutionspuffer eluiert.

### 3.2.2 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentration aufgereinigter DNA-Proben wurde unter der Verwendung des Nanodrop<sup>®</sup> 2000c Photometers bestimmt. Als Negativkontrolle diente dabei der für die Elution eingesetzte QIAGEN<sup>TM</sup> Elutionspuffer. Für die nachfolgende qPCR wurde eine Konzentration von 20 ng/µL DNA der Organproben eingesetzt.

### 3.2.3 Quantitative *Realtime*-PCR (qPCR)

Zur Bestimmung der Bakterienlast in den verschiedenen Organen wurden diese mittels einer qPCR auf das *traD* Gen hin untersucht. Die dafür genutzte *traD* qPCR wurde von Dr. Matthias Hauptmann 2013 in der Laborgruppe Keller am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) in Hamburg etabliert [30, 77]. Bei dem *traD* Gen handelt es sich um ein Gen, das für einen Teil des Typ IV Sekretionssystems von *O. tsutsugamushi* codiert und im *O. tsutsugamushi* Genom stark konserviert vorliegt. Für einen Reaktionsansatz wurden folgende, in Tabelle 3.1 aufgeführten Reagenzien benötigt.

**Tabelle 3.1: Reaktionsansatz für die *traD* qPCR**

Reagenz	Konzentration
10x Puffer	600 nM
dNTPs	200 $\mu$ M
BSA	100 $\mu$ g/mL
forward Primer ( <i>traD_fw</i> )	600 nM
reverse Primer ( <i>traD_rv</i> )	600 nM
Sybr Green	200 $\mu$ g/mL
Hotstar taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ L

Pro Probe werden 8  $\mu$ L dieses Mastermixes benötigt, wozu noch 2  $\mu$ L der Organprobe mit einer Konzentration von 20 ng/ $\mu$ L, eingesetzt wurden. Die qPCR wurde im LightCycler<sup>®</sup> 480 II durchgeführt. Dabei erfolgte die Aktivierung des Enzyms bei 95 °C für 10 min. Es folgten 45 Amplifikationszyklen mit jeweils 10 s bei 94 °C, 15 s bei 58 °C und 20 s bei 72 °C. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen und mittels einer Schmelzpunktanalyse auf ihre Spezifität hin überprüft. Die absolute Quantifikation der *traD* Kopienanzahl der gemessenen Proben wurde durch die "*2nd derivate maximum Methode*" in Relation zu einer externen Standardkurve aus einem linearisierten Standardplasmid mit bekannter *traD* Kopienanzahl ermittelt.

## 3.3 Tierexperimentelle Methoden

Für diese Arbeit wurden ausschließlich weibliche C57BL/6J Mäuse von Charles River genutzt, die zu Beginn des Versuches ein Alter von 6-9 Wochen aufwiesen. Die Haltung am BNITM erfolgte unter BSL3 Bedingungen in speziell belüfteten Käfigen (*IVCs*, engl. *individually ventilated cages*). Zur Akklimatisierung der Tiere lagen zwischen dem Eintreffen der Tiere am BNITM und dem Beginn der Experimente mindestens sieben Tage.

### 3.3.1 Infektion mit *Orientia tsutsugamushi* und Injektion von L929 Kontrollzellen

Mit *O. tsutsugamushi* infizierte Inokulate bzw. nicht infizierte L929-Kontrollinokulate wurden zügig in der Hand aufgetaut. Nach einer tropfenweisen Zugabe von 1 mL R5F<sup>-G</sup> wurde die Suspension in ein 15 mL Falcon überführt und tröpfchenweise weitere 8 mL Medium hinzugefügt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand entfernt,

das Pellet in 1 mL PBS resuspendiert und bei 9300x g für 5 min erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend entsprechend der zuvor mittels *Immunofocus*-Assay ermittelten Infektiosität in einem entsprechenden Volumen PBS resuspendiert. Für die subkutanen/intradermalen (sc./id.) Infektionen dieser Arbeit wurde eine Infektionsdosis von 25.000 *sfu* eingesetzt. Die Mäuse wurden zunächst mit 10 µL/g Körpergewicht eines Ansatzes aus Ketamin (12 mg/mL) und Xylacin (1,6 mg/mL) intraperitoneal narkotisiert. Nach dem Verlust des Zwischenzehenreflexes erfolgte die Infektion durch eine sc./id. Injektion von 50 µL des infizierten bzw. nicht infizierten Inokulates verteilt über mehrere Injektionsorte in die Fußsohle des rechten Hinterbeines der Maus.

### 3.3.2 Injektion von Antikörpern

Für die Blockadeexperimente dieser Arbeit wurden je nach Experiment 400 µg α-CTLA-4 (Klon 4F10), 250 µg α-PD-1 (Klon RPM1-14), 200 µg α-TIM-3 (Klon RMT3-23) sowie 100 µg α-LAG-3 (Klon C9B7W) einzeln bzw. teilweise in Kombination intraperitoneal (ip.) in einem Gesamtvolumen von 250 µL in PBS injiziert. Für eine frühe Blockade während der akuten Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion erfolgte die Injektion an den Tagen 0, 4 und 8 p.i., während die späte Blockade während der chronischen Phase der Infektion an den Tagen 21, 25 und 29 p.i. durchgeführt wurde.

### 3.3.3 Präparation von Organen

Um die Organe auf ihre Bakterienlast hin zu untersuchen bzw. durchflusszytometrische Analysen durchführen zu können, wurden zunächst die Organe an den gewünschten Analysezeitpunkten entnommen. Dazu wurde den Mäusen eine Überdosis (15 µg/g Körpergewicht) einer Ketamin- (12 mg/mL) und Xylacin- (1,6 mg/mL) Lösung ip. injiziert. Nachdem keine Reflexe mehr nachzuweisen waren, wurde die Bauchdecke geöffnet und ein Ausbluten der Maus durch eine Durchtrennung der *Vena cava* hervorgerufen. Um ein Kollabieren der Lunge zu erreichen, wurde anschließend das Diaphragma angeschnitten und der Brustkorb geöffnet. Es folgte eine Herzpunktion in den rechten Ventrikel. Eine Knopfkanüle wurde anschließend durch die Punktionsstelle in den rechten Ventrikel eingeführt, wodurch eine Perfusion der Lunge durch die *Arteria pulmonalis* mit 5 mL PBS ermöglicht wurde. Dies war nötig, um die intravaskulären Leukozyten der Lunge zu entfernen. Die Lunge wurde dabei so lange gespült, bis sich diese weiß färbte. Nach erfolgreicher Lungenperfusion wurde zunächst die Lunge entnommen. Anschließend wurden Herz, Leber, Milz, Gehirn und zuletzt der popliteale Lymphknoten aus dem rechten Hinterbein der Maus präpariert und in einer 6-Well Platte in R5F<sup>-G</sup> auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### 3.3.4 Ethik

Die Tierversuche wurden von der Behörde für Umwelt und Gesundheit (Fachabteilung Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen) mit dem Titel "Aktivierung und Regulation der Immunantwort in der Infektion mit *Orientia tsutsugamushi*" (Genehmigungsnummer:

---

106/15) genehmigt. Bei der Durchführung der Experimente wurde streng auf die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes geachtet.

### 3.4 Statistik

Die statistische Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Version 5.0b). Die statistischen Unterschiede wurden in den meisten Fällen durch nicht-parametrische Tests (Kruskall-Wallis Test mit Dunns *post test*; Mann Whitney-Test (zweiseitig)) ermittelt, da aufgrund der geringen Anzahl an Replikaten ( $n < 8$ ) kein Test auf Normalverteilung durchgeführt werden konnte. Bei Experimenten mit  $n > 8$  wurde nach bestätigter Normalverteilung eine One bzw. Two Way ANOVA mit einer Bonferroni Korrektur durchgeführt. Die p-Werte sind in den Graphiken folgendermaßen gekennzeichnet vorzufinden: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . In allen Experimenten sind die Mittelwerte mit Fehlerbalken basierend auf dem SEM (engl. *standard error of the mean*) angegeben.

## 4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war eine Untersuchung des Einflusses der negativen T-Zell-Stimulation auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort sowie deren Folgen für den Verlauf einer *O. tsutsugamushi* Infektion in C57BL/6 Mäusen. Durch eine gezielte *in vivo* Blockade koinhibitorischer Rezeptoren mittels Antikörpern konnte bei anderen Infektionsmodellen eine gesteigerte T-Zell-Effektorantwort, verbunden mit einer reduzierten Erregerlast, gezeigt werden. Ob sich ähnliche Effekte bei einer *O. tsutsugamushi* Infektion verzeichnen lassen, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Untersuchungen der Bakterienlast untersucht. Über die negativen Regulatoren in *O. tsutsugamushi* infizierten C57BL/6 Mäusen ist bisher wenig bekannt, so dass zunächst einmal von Interesse war, welchen Einfluss die Infektion auf die Expression der koinhibitorischen Rezeptoren hat. Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf den vier negativen Regulatoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3.

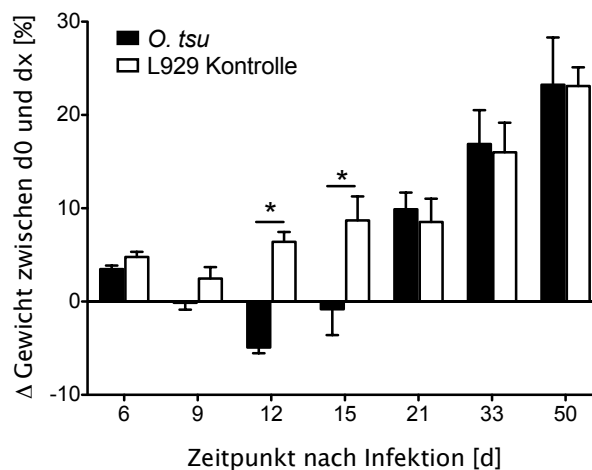
### 4.1 T-Zell-Antwort einer *Orientia tsutsugamushi* Infektion in der C57BL/6 Maus

Zur Untersuchung der vier negativen Regulatoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 wurden C57BL/6 Mäuse sc./id. mit 25.000 *sfu O. tsutsugamushi* infiziert und an sieben verschiedenen Zeitpunkten (d6, 9, 12, 15, 21, 33 und 50 p.i.) Organproben entnommen. Lungen- und Milzzellen wurden genutzt, um mittels durchflusszytometrischer Analyse die Expression diverser Aktivierungsmarker und der negativen Regulatoren auf Lymphozyten zu bestimmen. Als Kontrollen dienten Mäuse, die nicht infizierte L929 Zellen in die Fußsohle injiziert bekamen. Zudem wurde in Lunge, Milz, Lymphknoten, Gehirn, Leber und Herz jeweils die Bakterienlast mit Hilfe einer *traD* qPCR bestimmt. Während des gesamten Infektionsverlaufes wurde das Gewicht der Tiere als Vitalparameter erhoben.

#### 4.1.1 Reduzierter Gesundheitszustand nach der *O. tsutsugamushi* Infektion

Um den Gesundheitszustand der Mäuse im Verlauf einer *O. tsutsugamushi* Infektion beurteilen zu können, wurde das Gewicht der Mäuse regelmäßig kontrolliert. In Abbildung 4.1 ist die Gewichts Differenz zwischen d0 und dem jeweiligen Tag der Gewichtsnahme dx in % im Verlauf der Infektion von d6 bis d50 p.i. im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollmäusen (L929 Kontrolle) dargestellt.





**Abbildung 4.1: Gewichtsveränderungen in *O. tsutsugamushi* infizierten C57BL/6 Mäusen.**

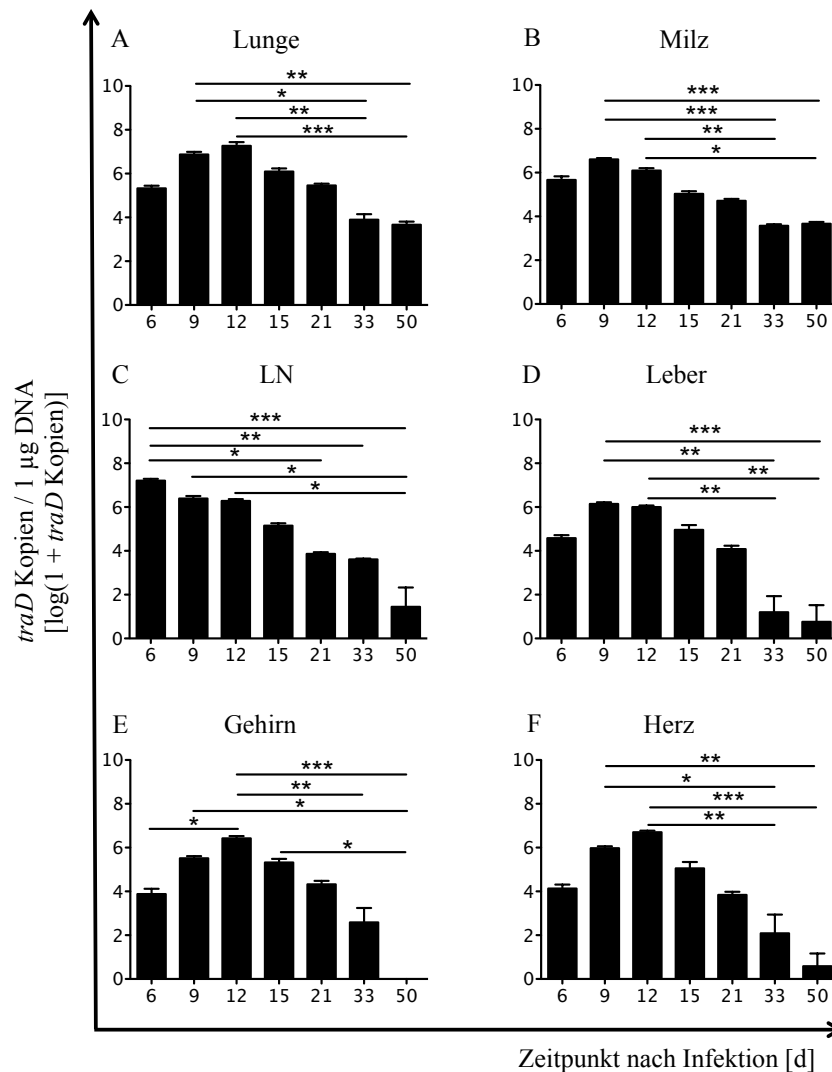
Gezeigt ist der Infektionsverlauf beurteilt nach Gewichtsänderungen von infizierten Mäusen (*O. tsu*), die 25.000 *sfu* *O. tsutsugamushi* und nicht infizierten Mäusen (L929 Kontrolle), die nicht infizierte L929 Zellen sc./id. injiziert bekamen. Dargestellt ist die Differenz des Körpergewichtes in % zwischen dem jeweilig gemessenen Zeitpunkt nach der Infektion (dx) und dem Ausgangsgewicht am Tag der Infektion (d0) bei infizierten und nicht infizierten Mäusen. Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5). \* $p < 0,05$  verglichen mit der jeweiligen naiven Kontrollgruppe; Two way ANOVA mit Bonferroni Korrektur. SEM = standard error of the mean.

Die nicht infizierten Mäuse zeigten von d6 bis d50 eine stetige Zunahme des Gewichtes in % im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht an d0. Die mit *O. tsutsugamushi* infizierten Mäuse zeigten hingegen ab d9 eine Abnahme des Gewichtes in % im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht an d0, wobei sie an d12 ihr geringstes Gewicht mit einer Abnahme von ca. 5 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht zeigten. An d9 und d15 p.i. unterschied sich das Gewicht der infizierten und nicht infizierten Mäuse signifikant. Ab d15 nahmen die infizierten Mäuse zu, so dass sie ab d21 eine mit den nicht infizierten Mäusen vergleichbare Gewichtszunahme für den verbleibenden beobachteten Zeitraum aufweisen konnten.

Die Gewichtsdaten zeigten, dass eine Infektion mit *O. tsutsugamushi* eine deutliche Reduktion des Gewichtes in dem Zeitraum von d9-d15 p.i. hervorruft und somit auf eine Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes schließen lässt.

#### 4.1.2 Organtropismus von *Orientia tsutsugamushi*

Neben der Untersuchung des Gesundheitszustandes wurde der Verlauf und die Ausbreitung der *O. tsutsugamushi* Infektion untersucht. Die Erregerlast wurde dabei in verschiedenen Organen mittels der für *O. tsutsugamushi* spezifischen *traD* qPCR an den Tagen 6, 9, 12, 15, 21, 33 und 50 p.i. bestimmt. In Abbildung 4.2 ist die Bakterienlast, in Form von *traD* Kopien in Lunge (A), Milz (B), poplitealer Lymphknoten (C; LN), Leber (D), Gehirn (E) und Herz (F) im Verlauf der Infektion pro 1  $\mu$ g DNA dargestellt.



**Abbildung 4.2: Bakterienlast in verschiedenen Organen im Verlauf einer *O. tsutsugamushi* Infektion bei C57BL/6 Mäusen.** Die Bakterienlast wurde an d6, 9, 12, 15, 21, 33 und 50 p.i. in Lunge (A), Milz (B), poplitealer Lymphknoten (C; LN), Leber (D), Gehirn (E) und Herz (F) von infizierten C57BL/6 Mäusen mittels *traD* qPCR bestimmt. Gezeigt ist die Bakterienlast in Form von *traD* Kopien im Verlauf der Infektion pro 1 µg DNA. Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; n=5). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *post test*.

Die Messungen zeigten, dass an d6 p.i. für den Lymphknoten mit  $10^7$  *traD* Kopien pro 1 µg DNA die höchste Bakterienlast zu messen war, während in den anderen untersuchten Organen die nachgewiesene Kopienzahl zwischen  $10^4$  und  $10^5$  lag. Für den Lymphknoten stellte d6 p.i. zudem das Maximum dar. Zwölf Tage nach der Infektion konnten in Gehirn, Herz und Lunge ihre jeweilig höchsten *traD* Kopien im Verlauf der Infektion gemessen werden, wobei die Lunge mit etwa  $10^7$  *traD* Kopien die höchste Bakterienlast an diesem Zeitpunkt zeigte und als Hauptorgan der Infektion gilt. Auch während der späten Phase der Infektion (d15 - d50 p.i.) konnten in allen Organen *traD* Kopien nachgewiesen werden. Lediglich im Gehirn waren an d50 p.i. keine Orientien mehr detektierbar.

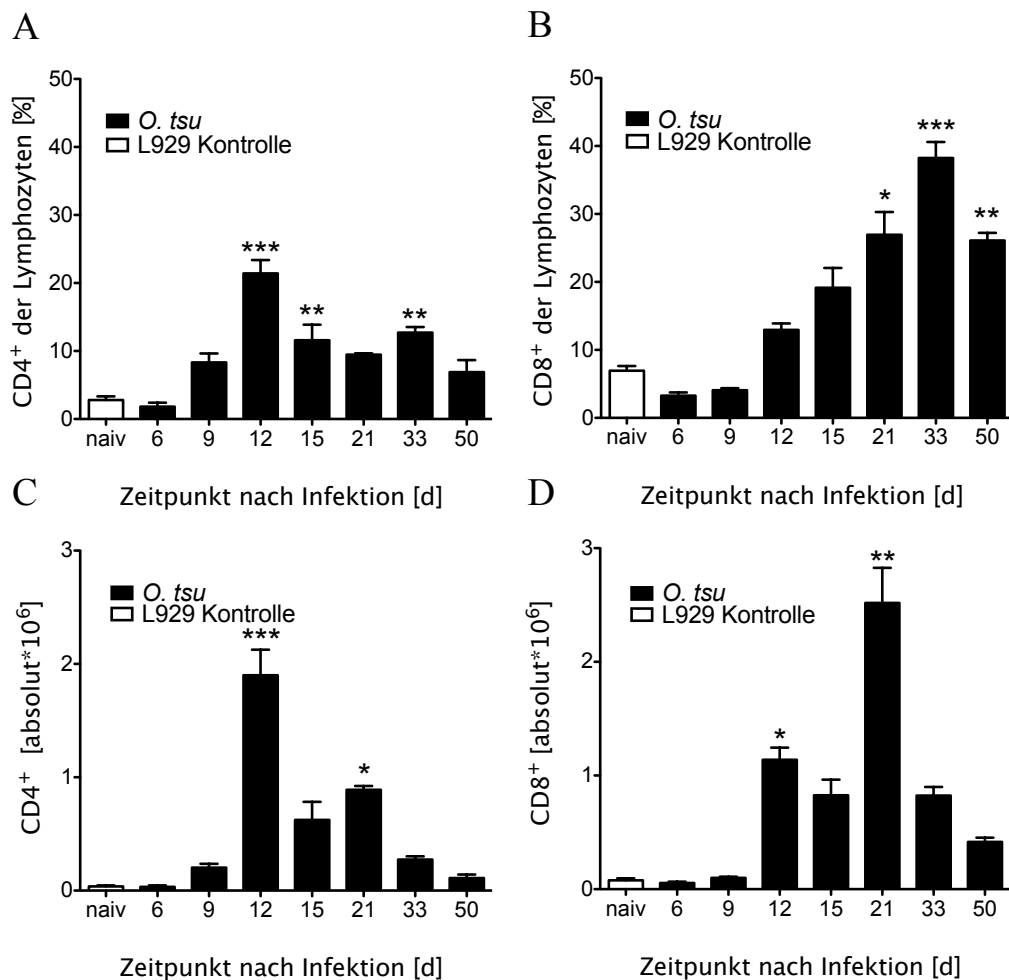
Die Daten zeigen deutlich, dass sich die Bakterien nach einer sc./id. Infektion in den rechten Hinterfuß der Maus ihren Weg über den Infektionsort drainierenden Lymphknoten (d6 p.i.) über die Milz und die Leber (d9 p.i.) suchen und sich schließlich in alle untersuchten Organe ausbreiten (d12 p.i.). Erst an späteren Zeitpunkten (d15 - d50 p.i.) nimmt die

Bakterienlast wieder ab, bleibt aber weiterhin detektierbar. Ähnliche Ergebnisse konnten auch schon im Balb/c-Mausmodell gezeigt werden [30, 77].

In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe sowie in Arbeiten von Shirai *et al.*, konnte gezeigt werden, dass sich die Bakterien durch eine Immunsuppression jederzeit wieder reaktivieren lassen und die *traD* Kopienzahl daraufhin erneut ansteigt [Hauptmann *et al.*, Manuskript in Vorbereitung]; [49]. Deshalb wird im Verlauf dieser Arbeit der Zeitraum von d21 - d50 p.i. als chronische Phase der Infektion bezeichnet, während die Zeitpunkte d6 - d21 die akute Phase der Infektion darstellen.

#### 4.1.3 Invasion der T-Lymphozyten in die Lunge während der akuten Phase der Infektion

Neben der Untersuchung des Gewichtes und der Bestimmung der Bakterienlast bei *O. tsutsugamushi* infizierten Mäusen ist die Charakterisierung der Lymphozyten ein wichtiger Anhaltspunkt, um eine Aussage über den Verlauf der Infektion und die Beteiligung des adaptiven Immunsystems zu treffen. Dabei wurden isolierte Lungenzellen und Milzzellen mittels Antikörper gegen verschiedene Lymphozytenmarker gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. In Abbildung 4.3 ist einerseits der Anteil der CD4<sup>+</sup> (A) bzw. CD8<sup>+</sup> (B) T-Zellen an der Gesamt-Lymphozytenpopulation dargestellt. Ihnen gegenübergestellt sind die absoluten Zellzahlen pro Organ in C und D.



**Abbildung 4.3: Verlauf der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge von *O. tsutsugamushi* infizierten C57BL/6 Mäusen.** Isolierte Lungenzellen aus infizierten (*O. tsu*) und nicht infizierten (L929 Kontrolle) C57BL/6 Mäusen wurden mit Antikörpern gegen (A; C) CD4 (APC-Cy7) und (B; D) CD8 (PerCP-Cy5.5) gefärbt und ihre Anzahl der Lymphozyten in % (A, B) anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. (C, D) Dargestellt ist die Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen pro Organ im Verlauf der Infektion. Gezeigt ist eines von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; *O. tsu* n=5; L929 Kontrolle/naiv n=21). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 jeder Zeitpunkt verglichen mit der naiven Kontrollgruppe; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *post test*.

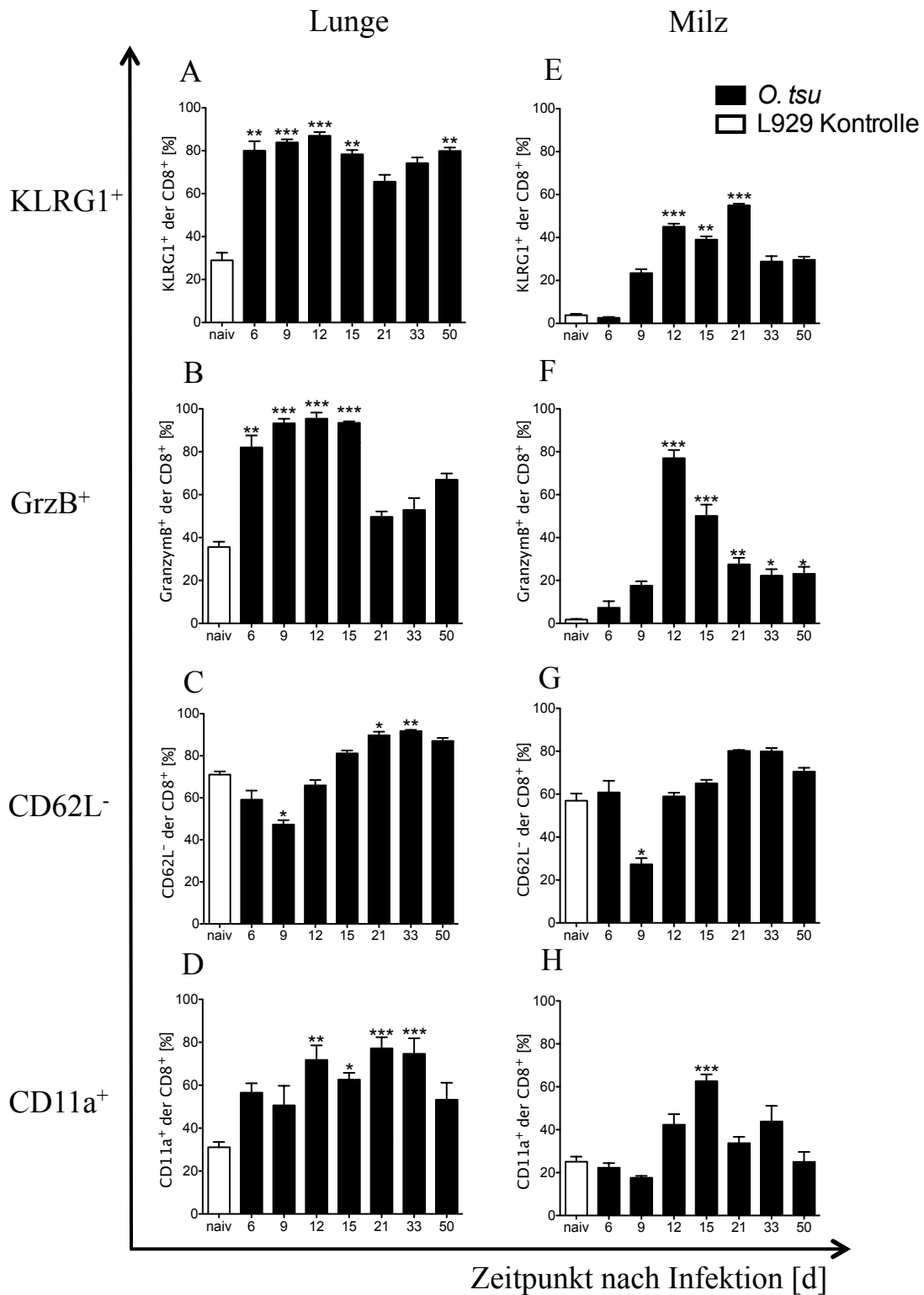
Eine Infektion mit *O. tsutsugamushi* führte ab d9 p.i. zu einem relativen Anstieg an CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge von C57BL/6 Mäusen (Abbildung 4.3; A). An d12 p.i. konnte nicht nur die höchste Bakterienlast in den untersuchten Organen (Lunge, Milz, Leber, Gehirn und Herz) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.2), sondern mit ca. 20 % der Lymphozyten lag zudem ein Maximum an CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor. Nach d12 p.i. nahm der relative Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wieder ab, bis sie sich an d50 nach Infektion an das Level der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in naiven Mäusen annäherten. Die relativen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Abbildung 4.3; B) nahmen in der Lunge hingegen ab d12 p.i. kontinuierlich zu, bis sie an d33 mit etwa 40 % der Lymphozyten ihr Maximum erreichten und das, obwohl in diesem Zeitraum der chronischen Phase die Bakterienlast in den untersuchten Organen bereits abnahm (siehe Abbildung 4.2). Erst an d50 p.i. nahmen die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten wieder ab, behielten jedoch mit 30 % aller Lymphozyten weiterhin ein deutlich erhöhtes Level im Vergleich zu den naiven Mäusen, bei denen die Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei unter 10 % der Lymphozyten lag. Auch die absoluten Zahlen zeigten

einen signifikanten Anstieg an CD4<sup>+</sup> T-Zellen (C) an d12 und d21 p.i. in der Lunge. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen (D) zeigten ebenfalls einen signifikanten Anstieg in der Lunge an d12 und d21 p.i.. Die absoluten Zahlen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nahmen zwar an d33 und d50 p.i. wieder ab, lagen jedoch immer noch im Vergleich zu der naiven Kontrollgruppe tendenziell erhöht vor. Aufgrund des gewählten nicht-parametrischen statistischen Tests war das Ergebnis jedoch nicht signifikant.

Anhand der Daten zeigt sich deutlich, dass auch in der chronischen Phase der Infektion (d21 - d50 p.i.), in der keine Gewichtsunterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Mäusen (siehe Abbildung 4.1) und eine nur geringe Bakterienlast (siehe Abbildung 4.2) nachgewiesen werden konnte, das Lymphozytenkompartiment der Lunge dauerhaft verändert bleibt. Es handelt sich dabei nicht nur um eine relative Verschiebung der T-Lymphozyten, sondern eine auf den absoluten Zahlen basierende chronische Entzündung, die sich durch eine Anwesenheit von vor allem CD8<sup>+</sup> T-Zellen auszeichnet. Es kommt also zu einer Invasion der T-Lymphozyten in das Hauptorgan der Infektion mit *O. tsutsugamushi*, der Lunge, wobei vor allem die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Vergleich zu den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten quantitativ eine größere Rolle spielen und das über die akute Phase der Infektion hinaus.

#### 4.1.4 Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach Infektion

Mit der Untersuchung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Anteile der T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* besonders CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge eine Rolle spielen, indem diese vor allem in der chronischen Phase mit 30-40 % der Lymphozyten vertreten sind (siehe Abbildung 4.3). Mit weiteren durchflusszytometrischen Analysen wurden nun diese CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten vor der Analyse der negativen Kostimulatoren zunächst auf weitere Merkmale, wie zum Beispiel die Aktivierungsmarker KLRG1, GrzB, CD62L und CD11a und ihre Dynamik (siehe Abbildung 4.4) untersucht. Hierbei wurden neben den Lymphozyten der Lunge auch die der Milz vergleichend untersucht.



**Abbildung 4.4: Aktivierungsmarker auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten bei *O. tsutsugamushi* infizierten C57BL/6 Mäusen.** Isolierte Lungen- (A-D) und Milzzellen (E-H) von infizierten (*O. tsu*) und nicht infizierten (L929 Kontrolle) C57BL/6 Mäusen wurden an den aufgeführten Zeitpunkten mit Antikörpern gegen KLRG1 (FITC), GrzB (PE), CD62L (PE-Cy7) und CD11a (PE-Cy7) gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist die Anzahl der jeweiligen Marker auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in %. Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; *O. tsu* n=5; L929 Kontrolle/naiv n=21). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; jeder Zeitpunkt verglichen mit der naiven Kontrollgruppe; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *post test*.

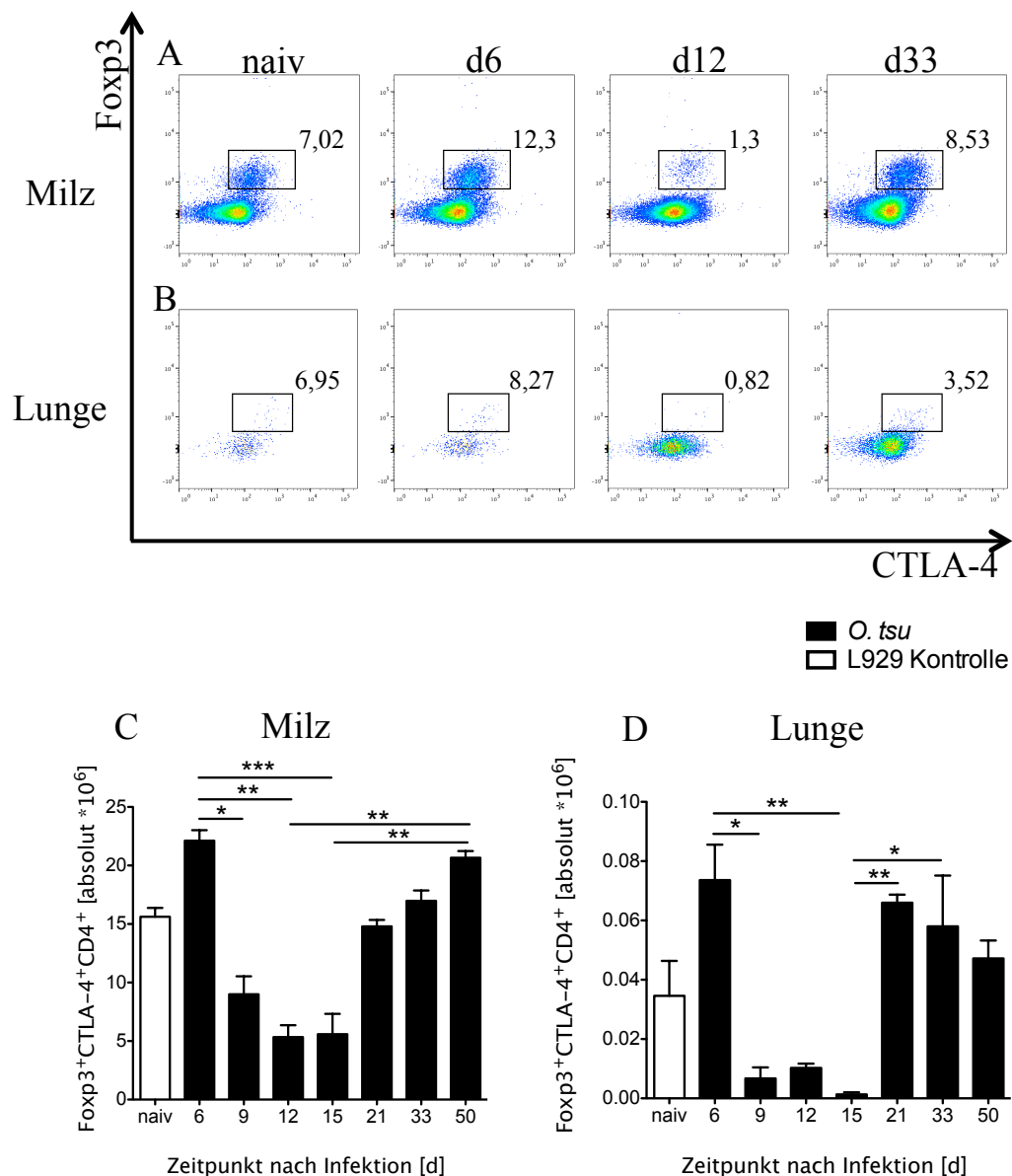
Die Färbung von KLRG1 (A) zeigte schon direkt an d6 p.i. einen signifikanten Anstieg in den pulmonalen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, obwohl sich zu diesem Zeitpunkt der Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen noch nicht verändert hatte (siehe Abbildung 4.1.3 B). In der Lunge blieb KLRG1 den gesamten untersuchten Zeitraum bis d50 p.i. der chronischen Phase der Infektion stark exprimiert und somit auch während die Bakterienlast in den untersuchten Organen bereits wieder abnahm (siehe Abbildung 4.2). In der Milz konnte KLRG1 erst an d12-21 p.i. signifikant erhöht nachgewiesen werden (E) und scheint demnach nur während der akuten Phase, in der die Bakterienlast in den Organen noch stark erhöht vorlag, eine Rolle zu spielen. Auch die GrzB Expression lag in der Lunge (B) direkt an d6 p.i. signifikant erhöht vor, ohne dass sich zu dieser Zeit der Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen schon geändert hatte. An d21 p.i. nahm die GrzB Expression in der Lunge jedoch wieder ab, während genau ab d21 p.i. die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge signifikant erhöht vorlagen (siehe Abbildung 4.1.3 B). Im Gegensatz dazu spielte GrzB in der Milz erst an d12 p.i., dem Zeitpunkt mit der überwiegend höchsten Bakterienlast in den untersuchten Organen (siehe Abbildung 4.2), mit einer signifikant erhöhten Expression eine Rolle. GrzB blieb zudem in der Milz bis d50 signifikant erhöht (F). CD62L<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten in der Lunge (C) erst während der chronischen Phase signifikant erhöht nachgewiesen werden, also in der Phase, in der die Bakterienlast bereits wieder abnahm, der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen jedoch signifikant zunahm. In der Milz konnte in der chronischen Phase der Infektion ebenfalls ein tendenziell gesteigerter Anteil an CD62L<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (G) gezeigt werden, dieser lag jedoch nicht signifikant vor. CD11a hingegen konnte in der Lunge (D) zwischen d12 und d33 p.i. gesteigert nachgewiesen werden, während es in der Milz (H) lediglich an d15 p.i. signifikant erhöht gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten eine starke Expression der untersuchten Aktivierungsmarker aufwiesen und im Verlauf der Infektion aktiviert vorlagen. In der Lunge zählten KLRG1 und GrzB zu den Markern, die besonders früh (d6 p.i.) nachgewiesen werden konnten, obwohl zu diesem Zeitpunkt der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen noch unverändert war. Die CD62L<sup>-</sup> Zellen konnten hingegen erst in der chronischen Phase gezeigt werden. In der Milz lagen vor allem KLRG1 und CD11a in der akuten Phase der Infektion vor, während GrzB sowohl in der akuten Phase als auch in der chronischen Phase nachgewiesen werden konnte. Generell zeigt sich aber deutlich, dass in der Milz die Aktivierungsmarker der CD8<sup>+</sup> T-Zellen erst später gezeigt werden können als in der Lunge. Interessanterweise bleiben die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten auch in der chronischen Phase der Infektion aktiviert, obwohl gezeigt werden konnte, dass in dieser Phase die Bakterienlast bereits in der Nähe der Nachweisgrenze der PCR vorlag.

#### 4.1.5 Abnahme der CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Tregs) nach der Infektion

Im Kapitel 4.1.4 wurde die Aktivierung der T-Lymphozyten beschrieben, die üblicherweise durch eine Infektion von *O. tsutsugamushi* ausgelöst wird. Jede normal verlaufende Immunantwort besteht jedoch aus einem Gleichgewicht zwischen der Expression der aktivierten, für den Krankheitserreger spezifischen, T-Lymphozyten und gleichzeitig einer

Gegenregulation, die eine überschießende Aktivierung verhindert. Dabei spielen die regulatorischen Mechanismen eine wichtige Rolle [65, 111]. Zu den bekanntesten Zellen, die für die Regulation der Immunantwort verantwortlich sind, gehören die regulatorischen T-Zellen (Tregs), welche die Proliferation anderer Zellen supprimieren. Diese sind  $CD4^+$  T-Zellen, die CTLA-4 und Foxp3 exprimieren [111]. In Abbildung 4.5 sind die Tregs von naiven und mit *O. tsutsugamushi* infizierten Lungen- sowie Milzzellen im Verlauf der Infektion (d6 - 50 p.i.) dargestellt. Dafür wurden die isolierten Zellen mit Antikörpern für CD4, CTLA-4 und Foxp3 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.



**Abbildung 4.5: Abnahme regulatorischer T-Zellen in Milz und Lunge während der Infektion mit *O. tsutsugamushi*.** Isolierte Milz- (A; C) und Lungenzellen (B; D) von infizierten (*O. tsu*) und nicht infizierten (L929 Kontrolle) C57BL/6 Mäusen wurden mit Antikörpern gegen CD4 (V500) extrazellulär sowie CTLA-4 (BV421) und Foxp3 (Alexa Fluor 700) intrazellulär gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. A und B zeigen exemplarisch für d6, 12 und 33 p.i. Dot Plot Diagramme von einer infizierten Maus im Vergleich zu einer nicht infizierten Kontrollmaus (naiv). (C, D) Dargestellt ist die Gesamtzahl der Foxp3<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen pro Organ im Verlauf der Infektion. Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; *O. tsu* n=5; L929 Kontrolle/naiv n=21). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 alle Zeitpunkte untereinander verglichen; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *post test*.

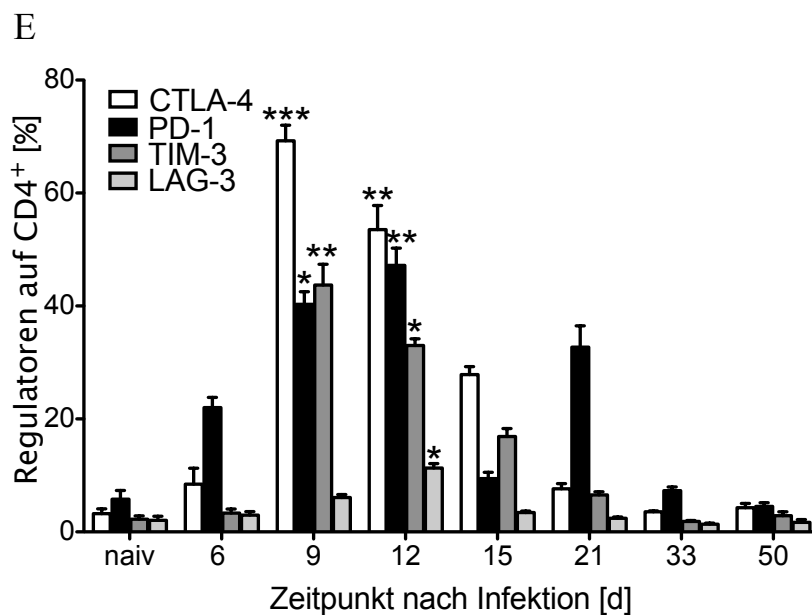
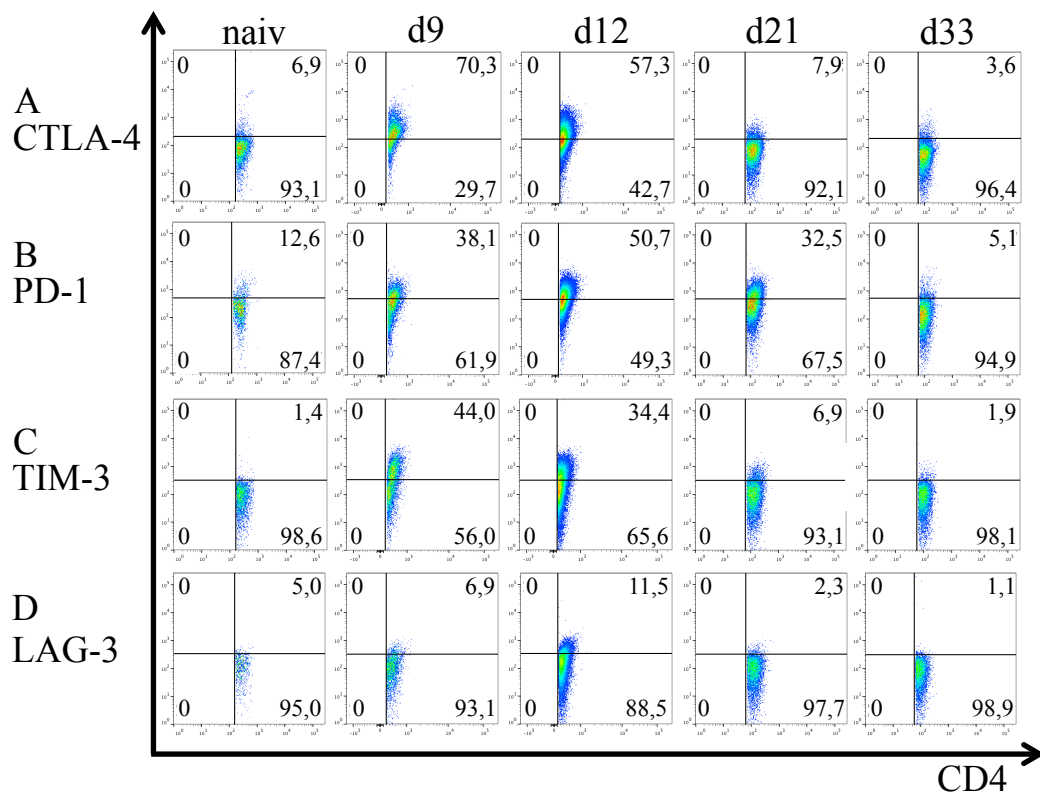


Als Beispiel für die Färbung der Tregs sind in A und B für Lunge und Milz exemplarische Dot Plot Diagramme mit den Foxp3<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen einer naiven Kontrollmaus im Vergleich zu den infizierten Mäusen an den Zeitpunkten d6, d12 und d33 p.i. dargestellt. Nicht infizierte Kontrollmäuse (naiv) wiesen in der Milz (C) eine Anzahl von  $15 \times 10^6$  Tregs je Organ auf, während in der Lunge (D) lediglich 30.000 Tregs vorhanden waren. Trotz der unterschiedlichen Ausgangssituation in Milz und Lunge, zeigten sowohl Milz als auch Lunge an d9 p.i. einen Abfall der Tregs um den Faktor 2 bei der Milz und Faktor 7 in der Lunge, der bis d15 p.i. anhielt. In der Milz waren in der akuten Phase der Infektion (d9 - d15 p.i.)  $5-10 \times 10^6$  Tregs zu messen, während in der Lunge in dem gleichen Zeitraum lediglich 10.000 Tregs vorhanden waren. An d21 p.i., während der chronischen Phase der Infektion, nahmen die Tregs wieder zu, so dass kein signifikanter Unterschied mehr zur naiven Kontrollgruppe zu verzeichnen war.

Die generelle Abnahme der Tregs in beiden Organen während der akuten Phase der Infektion deutet darauf hin, dass es zu keiner Expansion von Tregs als Regulatoren während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* kommt, sondern eher zu einem Verlust. Da jedoch zu einer funktionierenden Immunantwort die effektive Aktivierung der T-Lymphozyten im Gleichgewicht mit einer anschließenden Herunterregulation steht, ist zu vermuten, dass während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* andere Mechanismen der Immunregulation eingreifen.

#### **4.1.6 T-Zellen zeigen eine gesteigerte Expression der negativen Regulatoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 nach der Infektion**

Um zu untersuchen, ob negative Korezeptoren während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* anstelle der regulatorischen Tregs verstärkt exprimiert werden, wurden als nächstes die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Lunge auf ihre Expression der negativen Regulatoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 untersucht. Im Folgenden liegt der Schwerpunkt überwiegend auf der Lunge, da diese besonders stark infiziert (siehe Abbildung 4.2) und somit am besten geeignet ist, um infektionsspezifische Veränderungen nachzuweisen. So wurden isolierte Lungenzellen aus *O. tsutsugamushi* infizierten und nicht infizierten C57BL/6 Mäusen nach einer Färbung mit Antikörpern gegen die Regulatoren durchflusszytometrisch gemessen. In Abbildung 4.6 sind die Expressionen der verschiedenen Regulatoren von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Verlauf der Infektion (d6-50 p.i.) dargestellt, während in Abbildung 4.7 die Regulatoren auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten gezeigt werden.



**Abbildung 4.6: Expression negativer Korezeptoren auf pulmonalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der Infektion mit *O. tsutsugamushi*.** (A-E) Lungenzellen von infizierten (*O. tsu*) und nicht infizierten C57BL/6 Mäusen (naiv) wurden isoliert und mit Antikörpern gegen CD4 (V500), PD-1 (PE; B, E), TIM-3 (APC; C, E) und LAG-3 (PerCP-Cy5.5; D, E) extrazellulär sowie CTLA-4 (BV421; A, E) intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. (A-D) Exemplarische Dot Plots für jeweils eine naive und eine infizierte Maus für die d9, 12, 21 und 33 p.i.. (E) Gezeigt sind die untersuchten negativen Korezeptoren in % der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Verlauf der *O. tsutsugamushi* Infektion (d6 - d50 p.i.). Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; *O. tsu* n=5; naiv n=21). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 jeder Zeitpunkt verglichen mit der naiven Kontrollgruppe; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *post test*.

In A-D sind entsprechend für jeden negativen Korezeptor exemplarische Dot Plot Diagramme aufgeführt. Im naiven Zustand waren alle negativen Regulatoren auf CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit etwa 5-10 % vertreten (A-E). An d6 p.i. zeigten sowohl CTLA-4 als auch PD-1 (E) einen leichten Anstieg ihrer Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf etwa 10 % bzw. 20 %, wobei PD-1 mit seinen 20 % an d6 der am höchsten exprimierte Regulator war. An d9 konnte sowohl für CTLA-4 (A, E; 70 %) als auch PD-1 (B, E; 40 %) und TIM-3 (C, E; 30 %) ein signifikanter Anstieg verzeichnet werden. CTLA-4 und TIM-3 nahmen ab d12 p.i. stetig ab bis sie an d33 wieder an ihrem Ausgangsniveau, vergleichbar mit den naiven Mäusen, angekommen waren (A, C, E). PD-1 hingegen zeigte einen weiteren signifikanten Anstieg mit einem Maximum von 50 % an d12 p.i., worauf an d15 ein plötzlicher Abfall auf 10 % erfolgte, um dann noch einmal an d21 erneut auf 30 % anzusteigen (B, E). LAG-3 scheint im Vergleich zu den anderen untersuchten Regulatoren quantitativ gesehen auf den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten während der *O. tsutsugamushi* Infektion nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Trotzdem war auch bei LAG-3 ein langsamer Anstieg der Expression zu verzeichnen, der an d12 p.i. mit etwa 10 % in einem Maximum gipfelte, um dann wieder kontinuierlich auf das Ausgangsniveau vergleichbar mit einer naiven Maus zurückzugehen (D, E).

Der am schwächsten exprimierte Marker auf pulmonalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen war LAG-3, der auch gleichzeitig der am spätesten exprimierte Korezeptor war. PD-1 hingegen war unter den untersuchten negativen Korezeptoren der am frühesten exprimierte Rezeptor und zeigte zudem einen zweiphasigen Verlauf mit zwei Maxima an d9 und d21 p.i..

Auf den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten war CTLA-4 prozentual gesehen mit 70 % an d9 der am stärksten vertretene untersuchte negative Korezeptor. Da in Kapitel 4.1.5 bereits gezeigt werden konnte, dass die CTLA-4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* abnahmen, muss es sich bei diesen CTLA-4<sup>+</sup> T-Zellen um Foxp3<sup>-</sup> Zellen handeln und somit einen anderen Zelltyp als Tregs darstellen.

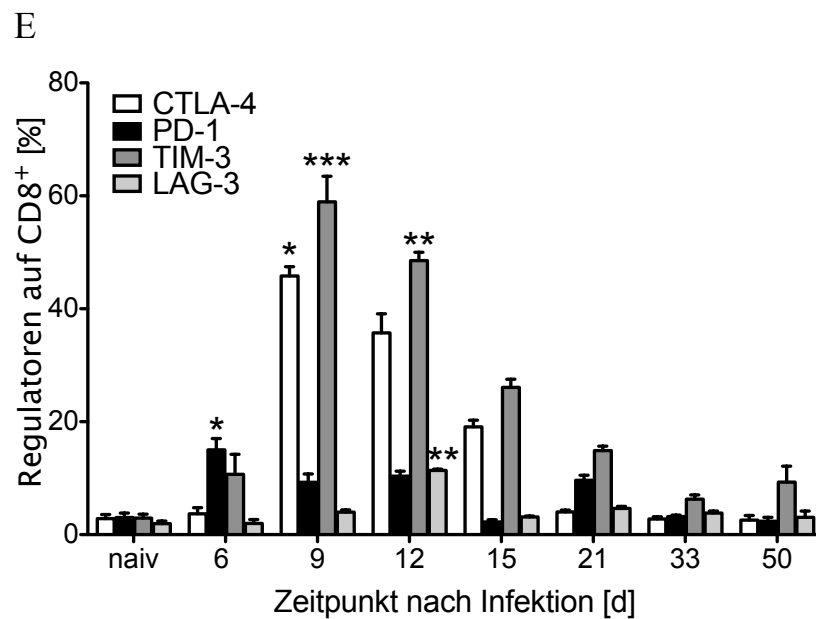
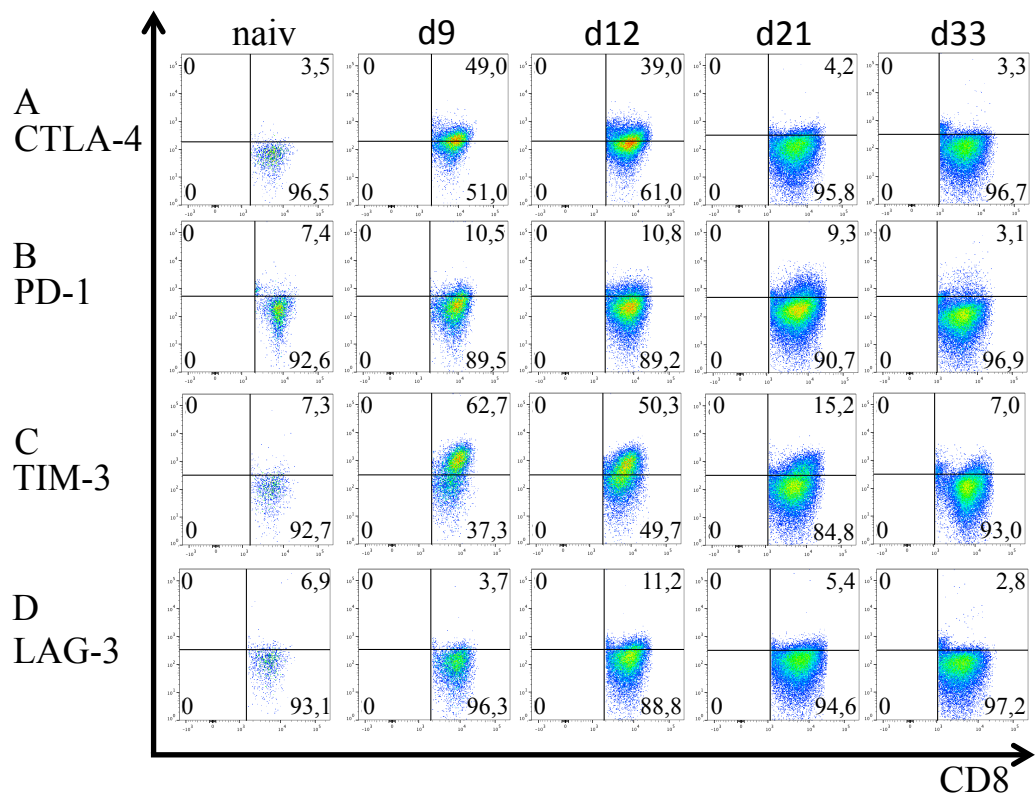


Abbildung 4.7: Expression negativer Korezeptoren auf pulmonalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der Infektion mit *O. tsutsugamushi*. (A-E) Lungenzellen von infizierten (*O.tsu*) und nicht infizierten C57BL/6 Mäusen (naiv) wurden isoliert und mit Antikörpern gegen CD8 (FITC), PD-1 (PE; B, E), TIM-3 (APC; C, E) und LAG-3 (PerCP-Cy5.5; D, E) extrazellulär sowie CTLA-4 (BV421; A, E) intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. (A-D) Exemplarische Dot Plots für jeweils eine naive und eine infizierte Maus für die d9, 12, 21 und 33 p.i.. (E) Gezeigt sind die untersuchten negativen Regulatoren in % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Verlauf der *O. tsutsugamushi* Infektion (d6 - 50 p.i.). Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; *O.tsu* n=5; naiv n=21). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 jeder Zeitpunkt verglichen mit der naiven Kontrollgruppe; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *post test*.

In A-D sind für jeden negativen Korezeptor exemplarische Dot Plot Diagramme aufgeführt. Auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abbildung 4.7) fand sich eine andere Dynamik der Expression negativer Regulatoren als auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abbildung 4.6), wobei die Ausgangssituation im naiven Zustand der Maus mit etwa 5-7 % auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen (A-E) für alle Regulatoren noch mit der Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen vergleichbar war. An d6 p.i. war PD-1 erneut der am stärksten exprimierte Marker mit ca. 15 %, wobei es auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen gleichzeitig das Maximum von PD-1 darstellte (B, E). Zudem zeigte PD-1 auch auf den pulmonalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen zweiphasigen Verlauf mit zwei Maxima an d6 und d21 p.i.. Prozentual gesehen spielt PD-1 jedoch auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine stärkere Rolle. An d9 p.i. kam es erneut zu einem signifikanten Anstieg von CTLA-4 und TIM-3 positiver Zahlen, wobei allerdings TIM-3 mit 60 % auf 10 % mehr Zellen exprimiert war, als CTLA-4 (A, C, E). Der Anteil an TIM-3 und CTLA-4 positiven Zellen erreichte zudem an d9 p.i. sein Maximum, worauf eine kontinuierliche Abnahme bis d33 p.i. folgte. TIM-3 war unter allen untersuchten Regulatoren auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen im gesamten Infektionsverlauf (d9 - d50) der am stärksten vertretene Marker. LAG-3 spielte auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf der Infektion quantitativ gesehen eine untergeordnete Rolle und zeigte auch hier wieder erst an d12 sein Maximum mit etwa 10 % (D, E).

Zusammenfassend kann man sagen, dass PD-1 quantitativ auf CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten stärker vertreten war. Im Vergleich zu den CD8<sup>+</sup> T-Zellen war auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch der zweiphasige Verlauf von PD-1 mit seinen Maxima an d12 und d21 stärker ausgeprägt (Abbildung 4.6). Auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen stellt CTLA-4 den am stärksten vertretenen der untersuchten negativen Regulatoren dar, während auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen TIM-3 quantitativ am höchsten exprimiert wurde. Beide verzeichneten ihr Maximum bereits an d9 p.i.. LAG-3 zeigte hingegen sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten einen verzögerten Verlauf mit einer maximalen Expression an d12 und spielte quantitativ im Vergleich zu den anderen untersuchten Regulatoren mit maximal 10 % eine nur untergeordnete Rolle. Während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* werden zwar Tregs herunterreguliert (siehe Abbildung 4.5), jedoch kommt es zu einer gesteigerten Expression von CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Ob ihnen eine Rolle bei der negativen Regulation zukommt, wurde im Folgenden untersucht.

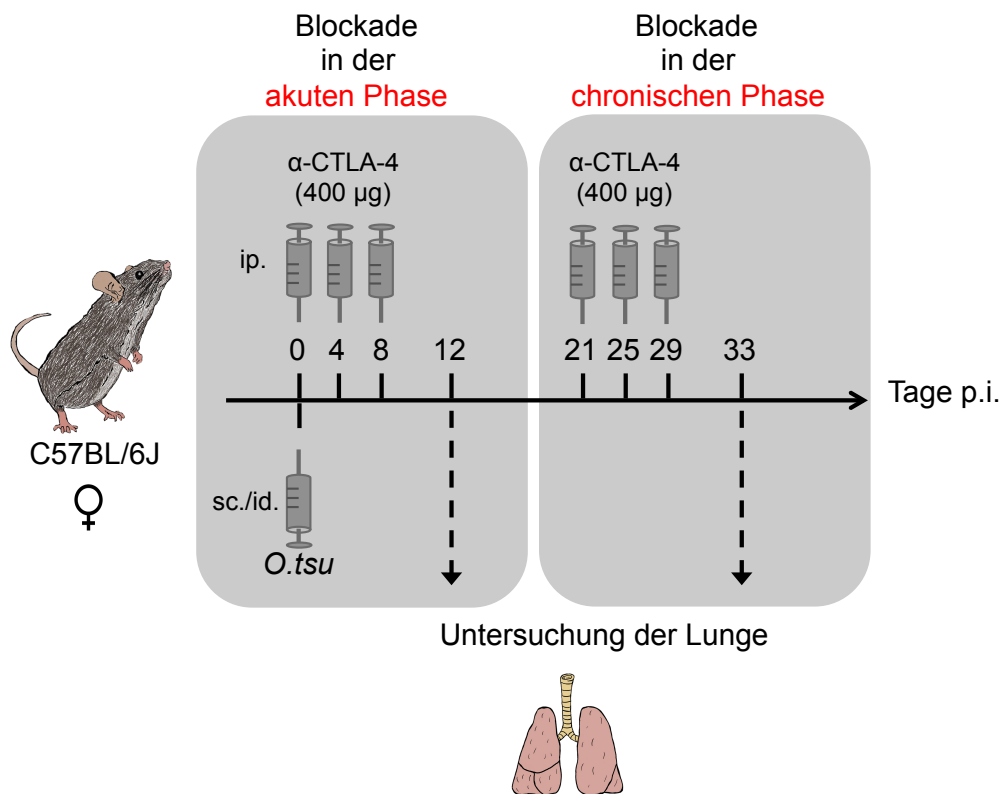
## 4.2 Einfluss der negativen Korezeptoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 auf die Infektion mit *Orientia tsutsugamushi*

In den vorherigen Kapiteln 4.1.5 und 4.1.6 konnte bereits gezeigt werden, dass zwar die regulatorischen T-Zellen im Verlauf einer *O. tsutsugamushi* Infektion abnehmen, die untersuchten negativen Regulatoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 jedoch erhöht exprimiert werden. Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses dieser negativen Regulatoren während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi*. Für andere Infektionsmodelle konnte bereits durch eine Blockade der untersuchten Regulatoren eine gesteigerte Immunantwort bei gleichzeitiger Reduktion der Erregerlast erreicht werden. So konnten Barber *et al.* durch eine Blockade mit PD-1 eine Wiederherstellung der T-Effektor-Funktion wäh-

rend einer Infektion mit LCMV (engl. *lymphocytic choriomeningitis virus*) verbunden mit einer reduzierten Viruslast erreichen [186]. Mäuse, die eine Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *L. monocytogenes* aufwiesen und mit  $\alpha$ -CTLA-4 behandelt wurden, reagierten mit einem Anstieg von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit gleichzeitiger erhöhter Effektorfunktion und reduzierter Erregerlast [184]. Um zu sehen, ob eine Blockade der negativen Regulatoren auch bei einer *O. tsutsugamushi* Infektion zu einer verminderten Bakterienlast führt, wurden in verschiedenen Experimenten CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 teilweise einzeln und teilweise in Kombination mittels Antikörper *in vivo* blockiert. Die Blockade erfolgte dabei während der akuten Phase sowie im Vergleich dazu während der chronischen Phase der Infektion.

#### 4.2.1 Blockade von CTLA-4 während der akuten und chronischen Phase der Infektion im Vergleich

In Kapitel 4.1.5 wurde gezeigt, dass während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* die CTLA-4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs sowohl in der Lunge als auch in der Milz herunterreguliert vorliegen. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg der Expression von CTLA-4<sup>+</sup> auf Foxp3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (siehe Kapitel 4.1.6) nach der Infektion, wobei CTLA-4 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen zudem mit maximal 70 % der am stärksten exprimierte und auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit maximal 50 % der am zweitstärksten exprimierte Regulator war. Aus diesem Grund wurde zunächst der Einfluss von CTLA-4 auf die Infektion mit *O. tsutsugamushi* untersucht. Dazu wurden zunächst C57BL/6 Weibchen sc./id. in die rechte Hinterpfote mit 25.000 *sfu* infiziert (siehe Abbildung 4.8).



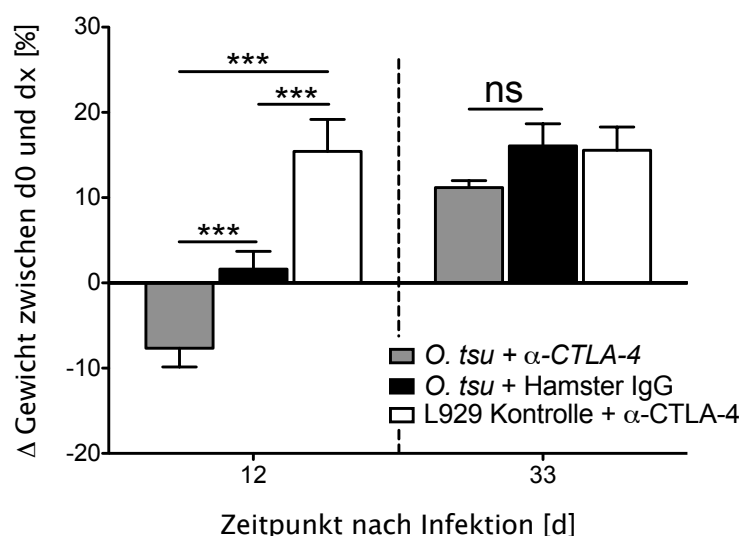
**Abbildung 4.8: Versuchsablauf der CTLA-4 Blockade in der akuten sowie in der chronischen Phase der Infektion.** Dargestellt ist der Versuchsablauf von zwei unabhängigen Experimenten. Für beide Experimente wurden C57BL/6 Weibchen an d0 mit 25.000 *sfu* *O. tsutsugamushi* (*O.tsu*) sc./id. in die rechte Hinterpfote infiziert. Einerseits erhielten die infizierten Mäuse während der frühen Blockade (akute Phase) eine dreimalige ip. Injektion von jeweils 400 µg α-CTLA-4 (Klon 4F10) in PBS in einem Gesamtvolumen von 160 µL an d0, 4 und 8 p.i.. An d12 p.i. erfolgte eine Untersuchung der Lunge auf ihre Bakterienlast (*traD* qPCR) und den Aktivierungsstatus der T-Lymphozyten mittels durchflusszytometrischer Analysen. In einem zweiten Experiment erhielten die infizierten Mäuse eine dreimalige späte Blockade (chronische Phase) durch i.p. Injektion von jeweils 400 µg α-CTLA-4 in PBS (Klon 4F10) an d21, 25 und 29 p.i., woraufhin an d33 ebenfalls eine Untersuchung der Lunge erfolgte. Als Kontrollgruppen dienten in beiden Experimenten ebenfalls *O.tsu* infizierte Mäuse, die anstelle einer α-CTLA-4 Behandlung 400 µg Hamster IgG in PBS erhielten.

In zwei unabhängigen Experimenten wurde CTLA-4 während der akuten Phase der Infektion und im Vergleich dazu während der chronischen Phase *in vivo* blockiert. Dabei soll untersucht werden, ob es einen Unterschied macht, wenn CTLA-4 während der *Priming*-Phase der T-Zellen fehlt, oder wenn die Blockade erst in der chronischen Phase (Persistenzphase der Bakterien), in der vor allem die CD8<sup>+</sup> T-Zellen signifikant erhöht vorliegen, stattfindet. Für die frühe Blockade erhielten sowohl infizierte als auch nicht infizierte Mäuse an den Tagen 0, 4 und 8 p.i. jeweils eine i.p. Injektion von 400 µg α-CTLA-4 in PBS. Die optimalen Blockadezeitpunkte wurden in Vorversuchen ermittelt, und auf Grundlage dieser Daten wurde dem dreimaligen Blockadeprotokoll der Vorzug gegenüber ein- bzw. zweimaliger Blockade gegeben (Daten nicht gezeigt). Für die Blockade während der chronischen Phase erhielten ebenfalls infizierte und nicht infizierte Mäuse 400 µg α-CTLA-4 i.p. an den Tagen 21, 25 und 29 p.i. injiziert. Als Analysezeitpunkt wurde für das Experiment mit der frühen Blockade der Zeitpunkt mit der stärksten Bakterienlast (d12 p.i.) gewählt (siehe Abbildung 4.2). Nach der späten Blockade wurde d33 p.i. als Analysezeitpunkt für optimal befunden, da zu diesem Zeitpunkt die Bakterienlast zwar schon stark gesunken vorlag, aber trotzdem mittels qPCR noch *traD* Kopien detektierbar

waren (siehe Abbildung 4.2). Bei der Analyse wurde der Schwerpunkt auf die Lunge als Hauptorgan der Infektion gelegt. Einerseits wurde die Bakterienlast mittels *traD* qPCR ermittelt und andererseits die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten durchflusszytometrisch auf ihren Aktivierungsstatus und ihre Zytokinproduktion hin charakterisiert.

#### 4.2.1.1 Eine frühe Blockade von CTLA-4 verstärkt die Symptomatik während der Infektion

Um zu sehen, ob eine Blockade von CTLA-4 einen Einfluss auf den Gesundheitszustand der infizierten und  $\alpha$ -CTLA-4 behandelten Mäuse im Vergleich zu nur infizierten Mäusen hat, wurde zunächst der Gesundheitszustand anhand des Gewichtes in der akuten und chronischen Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion überprüft (siehe Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9: Mausgewicht nach früher und später Blockade von CTLA-4.**

Mit *O. tsutsugamushi* infizierte C57BL/6 Mäuse wurden an den angegebenen Tagen mit jeweils 400  $\mu$ g  $\alpha$ -CTLA-4 (*O. tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4) bzw. Hamster IgG (*O. tsu* + Hamster IgG) ip. behandelt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Mäuse, die ebenfalls mit  $\alpha$ -CTLA-4 behandelt wurden (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -CTLA-4). Gezeigt ist die Gewichtsänderung zwischen d0 und d12 (links) bzw. d33 (rechts) p.i. in %. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=8). \*\*\*p<0,001; One Way ANOVA mit Bonferroni Korrektur.

Nach der frühen Blockade von CTLA-4 (d0, 4 und 8 p.i.) zeigten die infizierten Mäuse (*O. tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4) zwischen d0 und d12 p.i. eine Gewichtsabnahme von 10 % im Vergleich zur infizierten aber nicht blockierten Gruppe (*O. tsu* + Hamster IgG), bei denen eine minimale Gewichtszunahme von etwa 2 % im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht an d0 p.i. zu sehen war. Die nicht infizierten aber blockierten Mäuse (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -CTLA-4) zeigten hingegen eine Gewichtszunahme von etwa 15 % im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht. Während der Persistenzphase an d33 konnte nach der dreimaligen Blockade von CTLA-4 (d21, 25 und 29 p.i.) bei allen drei Gruppen eine Gewichtszunahme zwischen 12-15 % nachgewiesen werden, wobei sich kein Unterschied zwischen blockiert und nicht blockiert bzw. infiziert und nicht infiziert herausstellte. Der Einfluss der frühen CTLA-4 Blockade auf den Gesundheitszustand der Maus während einer *O. tsutsugamushi* Infektion konnte auch an einem reduzierten Gesamtzustand der Maus verbunden mit

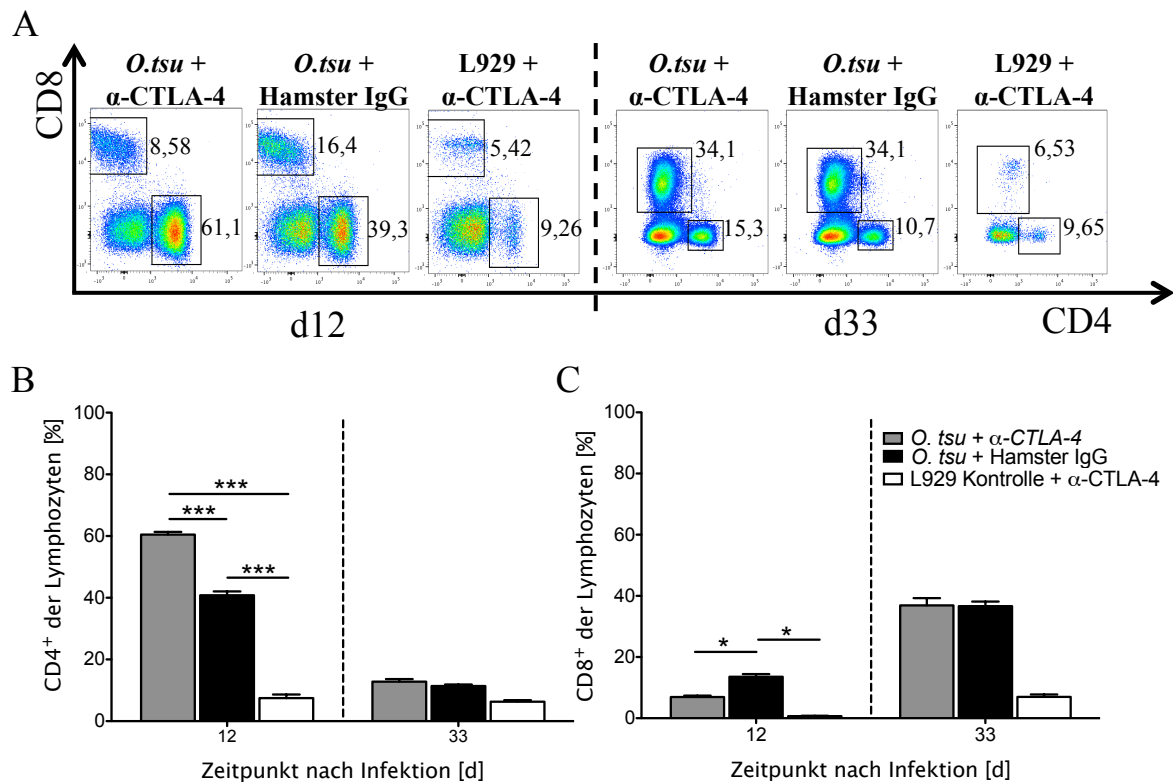


einer verschlechterten Fellbeschaffenheit und verstärkten Bewegungseinschränkungen der Mäuse gesehen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Daten veranlassen zur Annahme, dass eine dreimalige Blockade von CTLA-4 während der akuten Phase der Infektion in Verbindung mit einer Infektion von *O. tsutsugamushi* zu einer verstärkten Symptomatik führt, während sie auf die äußerlichen Krankheitsmerkmale nach der Blockade während der chronischen Phase keinerlei Einfluss hat. Beruhend auf der Annahme, dass eine Gewichtsabnahme ein Ausdruck einer Immunpathologie ist, könnte CTLA-4 diese Immunpathologie begrenzen.

#### **4.2.1.2 Invasion von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten bei gleichzeitigem CD8<sup>+</sup> T-Zell-Abfall nach früher CTLA-4 Blockade**

Neben den Gewichtsänderungen wurden die T-Lymphozyten der Lunge durchflusszytometrisch untersucht, um mögliche Einflüsse auf das Immunsystem nach einer Blockade von CTLA-4 ausfindig zu machen. Zunächst wurden hierfür die isolierten Lungenzellen infizierter und  $\alpha$ -CTLA-4 behandelter Mäuse (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4), infizierter und nicht blockierter Mäuse (*O.tsu* + Hamster IgG) sowie nicht infizierter aber blockierter Mäuse (L929 +  $\alpha$ -CTLA-4) mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. In Abbildung 4.10 A sind exemplarisch für eine Maus jeder Gruppe Dot Plots der CD4 und CD8 Färbung gezeigt.



**Abbildung 4.10: CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge nach früher und später CTLA-4 Blockade.** Mit *O. tsutsugamushi* infizierte C57BL/6 Mäuse wurden mit jeweils 400  $\mu$ g  $\alpha$ -CTLA-4 (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4) bzw. Hamster IgG (*O.tsu* + Hamster IgG) i.p. behandelt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Mäuse, die ebenfalls mit  $\alpha$ -CTLA-4 behandelt wurden (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -CTLA-4). Nach der Blockade während der akuten Phase der Infektion (d0, 4 und 8 p.i.) wurde der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Anteil der Lymphozyten an d12 p.i. nach einer Färbung mit Antikörpern gegen CD4 (APC-Cy7) und CD8 (PerCPy5.5) durchflusszytometrisch ermittelt (A-C; links). Nach der Blockade in der chronischen Phase (d21, 25 und 29 p.i.) erfolgte die durchflusszytometrische Analyse an d33 (A-C; rechts). (A) Gezeigt sind Dot Plots der CD4 und CD8 Färbung exemplarisch für jeweils eine Maus der unterschiedlich behandelten Gruppen. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup> (A, B) und CD8<sup>+</sup> (A, C) T-Zellen in % aller Lymphozyten der Lunge. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5). \*p<0,05, \*\*\*p<0,001; Kruskal Wallis-Test mit Dunns *post test*.

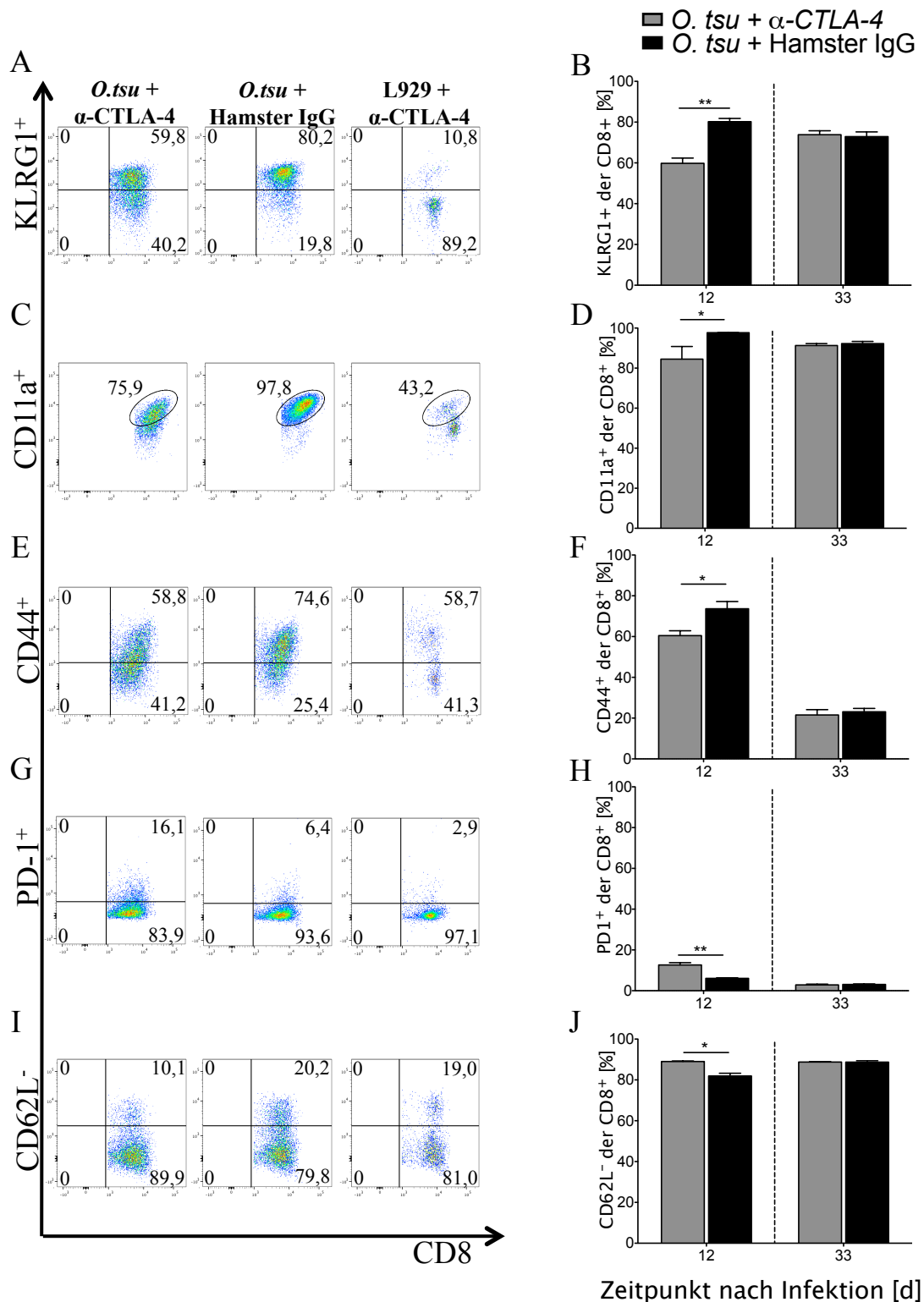
Etwa 40 % der pulmonalen Lymphozyten infizierter, nicht behandelter Mäuse (*O.tsu* + Hamster IgG) exprimierten CD4 an d12 p.i. (B). Durch eine Behandlung mit  $\alpha$ -CTLA-4 (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4) während der akuten Phase der Infektion stieg die Frequenz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf 60 % an. Die nicht infizierten aber blockierten Mäuse (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -CTLA-4) wiesen nur etwa 5 % CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge an d12 p.i. auf. Nach der Blockade in der chronischen Phase der Infektion konnte an d33 p.i. bei allen drei Gruppen ein relativer Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten von 5-10 % gezeigt werden. Die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten sind mit etwa 10 % an d12 p.i. in der infizierten aber nicht behandelten Gruppe (*O.tsu* + Hamster IgG) deutlich weniger vertreten als die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (C). Nach der dreimaligen Blockade zum frühen Zeitpunkt (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4) sinkt der relative Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen an d12 p.i. sogar weiter auf 5 %. In den nicht infizierten aber  $\alpha$ -CTLA-4 behandelten Mäusen konnten an d12 p.i. keine CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. An d33 p.i. zeigten zwar alle drei Gruppen einen erhöhten relativen Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu d12 p.i., jedoch hatte die Blockade von CTLA-4 bei gleichzeitiger Infektion mit *O. tsutsugamushi* (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4) keinen Einfluss auf den relativen CD8<sup>+</sup> Anteil. Sowohl die infizierten und nicht blockierten Mäuse

(*O.tsu* + Hamster IgG) als auch die infizierten und  $\alpha$ -CTLA-4 behandelten Mäuse (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4) zeigten an d33 einen relativen Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen von fast 40 % aller Lymphozyten in der Lunge. Bei den nicht infizierten Mäusen waren 5 % der Lymphozyten CD8<sup>+</sup> (L929 +  $\alpha$ -CTLA-4).

Eine CTLA-4 Blockade während der chronischen Phase hatte auf den relativen Anteil an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen keinen Einfluss. Eine Blockade während der akuten Phase hingegen verschiebt das Gleichgewicht von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge erheblich. Durch die Behandlung mit  $\alpha$ -CTLA-4 während der akuten Phase sind mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu finden, was entweder auf eine verstärkte Invasion der Zellen oder aber auf einen Anstieg der Proliferation zurückzuführen sein kann. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen nehmen hingegen nach der frühen Behandlung mit  $\alpha$ -CTLA-4 ab, wobei auch hier noch zu klären wäre, ob es sich dabei um eine geringere Teilungsaktivität der Zellen handelt, oder ob die Zellen an anderen Orten zu finden sind. Die Daten lassen vermuten, dass CTLA-4 bei der Infektion mit *O. tsutsugamushi* an der Homöostase der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge beteiligt ist.

#### 4.2.1.3 Frühe Blockade von CTLA-4 führt zu einer überwiegend reduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung

In Kapitel 4.1.3 wurde bereits darauf hingewiesen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei einer *O. tsutsugamushi* Infektion ab d12 p.i. in die Lunge einwandern. Während der chronischen Phase machen die CD8<sup>+</sup> T-Zellen etwa 20-40 % der gesamten pulmonalen Lymphozyten aus, und das obwohl in dieser Phase der Infektion die Bakterienlast bereits wieder abgenommen hat (siehe Abbildung 4.2). Wurden die infizierten Mäuse jedoch mit  $\alpha$ -CTLA-4 behandelt, waren weniger CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge nachweisbar (siehe Abbildung 4.10; C). Um untersuchen zu können, ob die Blockade von CTLA-4 auch einen Einfluss auf das Aktivierungsprofil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat, wurde die Expression von KLRG1, CD11a, CD44 und CD62L auf pulmonalen T-Lymphozyten infizierter Mäuse mit und ohne  $\alpha$ -CTLA-4 Behandlung nach einer Antikörperfärbung durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abbildung 4.11). Zusätzlich wurde der negative Korezeptor PD-1 im Rahmen der Untersuchungen des Aktivierungsstatus hinzugezogen. Seine gesteigerte Expression dient als Hinweis für eine verringerte Effektorfunktion, da PD-1<sup>+</sup> T-Zellen ein sogenannter „Erschöpfungszustand“ zugesprochen wird [190].



**Abbildung 4.11: Aktivierungsmarker auf CD8<sup>+</sup> Lungenzellen nach CTLA-4 Blockade.**

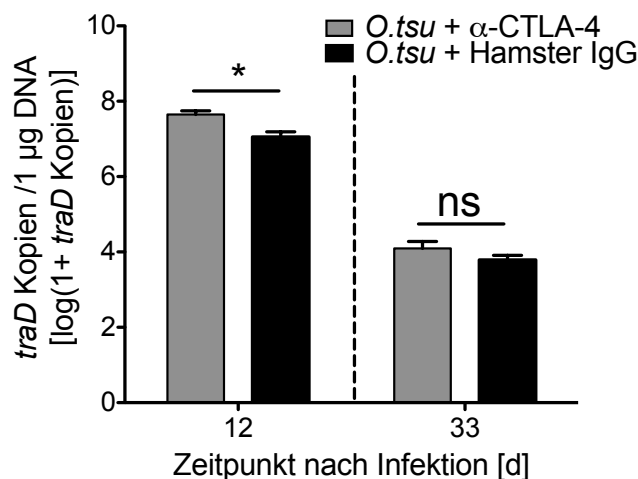
Mit *O. tsutsugamushi* infizierte C57BL/6 Mäuse wurden dreimalig mit jeweils 400  $\mu$ g  $\alpha$ -CTLA-4 (*O. tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4) bzw. Hamster IgG (*O. tsu* + Hamster IgG) ip. entweder in der akuten Phase oder in der chronischen Phase behandelt. Als Kontrollgruppe dienten nicht infizierte mit  $\alpha$ -CTLA-4 behandelte Mäuse (L929 +  $\alpha$ -CTLA-4). Isolierte Lymphozyten der Lunge wurden mit Antikörpern gegen KLRG1 (FITC; A, B), CD11a (PE-Cy7; C, D), CD44 (V500; E, F), PD-1 (PE; G, H) und CD62L (PE-Cy7; I, J) gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die gefärbten Marker auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in % nach der frühen (d12) und der späten (d33) Blockade (B, D, F, H, J) sowie für jeden Marker exemplarisch für eine Maus die zugehörigen Dot Plots (A, C, E, G, I) von d12 p.i.. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5). \*p<0,05, \*\*p<0,01; Mann Whitney-Test (zweiseitig).

Die CTLA-4 Blockade während der akuten Phase der Infektion (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4) führte an d12 p.i. zu einer signifikant verminderten Expression von KLRG1, CD11a und CD44 auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Lunge (A-F) im Vergleich zu infizierten aber nicht blockierten Mäusen (*O.tsu* + Hamster IgG). Gleichzeitig konnte ein signifikant erhöhter relativer Anteil an PD-1<sup>+</sup> und CD62L<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden (G-J). Eine Blockade in der chronischen Phase der Infektion führte bei allen fünf untersuchten Aktivierungsmarkern zu keiner veränderten Expression auf pulmonalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Bezüglich des Aktivierungszustandes lässt sich sagen, dass eine chronische Blockade von CTLA-4 keinerlei Einfluss auf die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, bezogen auf die untersuchten Marker KLRG1, CD11a, CD44, PD-1 und CD62L hat. Eine Blockade von CTLA-4 während der akuten Phase der Infektion führt jedoch durch eine reduzierte Expression von KLRG1, CD11a und CD44, sowie einer gesteigerten Expression von PD-1 zu einer verminderten Aktivierung verbunden mit einer geschwächten Effektorfunktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge. Lediglich der gesteigerte relative Anteil an CD62L<sup>-</sup> T-Zellen spricht für eine erhöhte Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Trotzdem kann in der Summe von einer überwiegend reduzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung nach einer frühen CTLA-4 Blockade ausgegangen werden. CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten lediglich einen Anstieg von GrzB nach der frühen Blockade von CTLA-4. Auf die anderen untersuchten Aktivierungsmarker hatte die Blockade von CTLA-4 keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.1.4 Höhere Bakterienlast in der Lunge nach einer Blockade von CTLA-4

In den Kapiteln 4.2.1.1, 4.2.1.2 und 4.2.1.3 wurde bereits darauf hingewiesen, dass eine dreimalige Blockade von CTLA-4 während der akuten Phase der Infektion die Symptomatik der *O. tsutsugamushi* Infektion an d12 p.i. verstärkte. Des Weiteren war eine Zunahme der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge bei einer gleichzeitigen Abnahme der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu sehen, die zudem eine reduzierte Aktivierung verbunden mit einer verminderten Effektorfunktion zeigten. Anschließend galt es zu klären, ob diese immunologischen Veränderungen, ausgelöst durch eine frühe CTLA-4 Blockade, die Erregerlast beeinflussten. Aufgrund der Publikationen zu anderen Infektionsmodellen, bei denen durch eine Blockade von CTLA-4 eine Steigerung der T-Zell-Immunantwort mit einer gleichzeitigen Reduktion der Erregerlast gezeigt werden konnte, wurde eine effizientere Pathogenabwehr auch bei einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* erwartet. In Abbildung 4.12 ist die Bakterienlast von *O. tsutsugamushi* in der Lunge nach früher Blockade von CTLA-4 (links) und nach später Blockade von CTLA-4 (rechts), jeweils im Vergleich zur infizierten aber nicht CTLA-4 behandelten Kontrollgruppe (*O.tsu* + Hamster IgG), dargestellt.



**Abbildung 4.12: Bakterienlast in der Lunge nach früher und später CTLA-4 Blockade.**

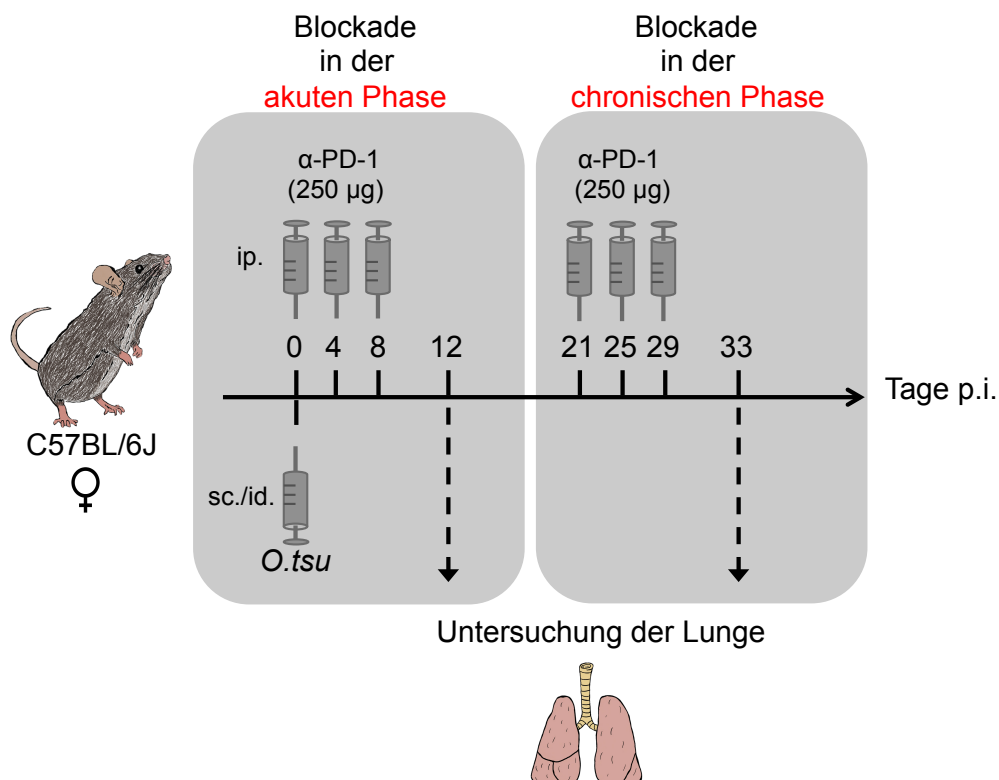
Die Bakterienlast wurde mittels *traD* qPCR in Lungen aus infizierten und  $\alpha$ -CTLA-4 (Klon 4F10) behandelten C57BL/6 Mäusen (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4) im Vergleich zu infizierten aber nicht  $\alpha$ -CTLA-4 behandelten (*O.tsu* + Hamster IgG) Mäusen gemessen. Dargestellt sind die *traD* Kopien pro 1  $\mu$ g DNA an d12 p.i. nach früher Blockade von CTLA-4 (links) und an d33 p.i. nach später Blockade von CTLA-4 (rechts). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5). \* $p < 0,05$ ; ns = nicht signifikant; Mann Whitney-Test (zweiseitig).

Eine frühe Blockade von CTLA-4 (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4) führte an d12 p.i. mit ca.  $10^8$  *traD* Kopien pro 1  $\mu$ g DNA zu einer signifikant erhöhten Bakterienlast in der Lunge im Vergleich zu den nicht  $\alpha$ -CTLA-4 behandelten Mäusen (*O.tsu* + Hamster IgG), bei denen die Bakterienlast bei etwa  $10^7$  *traD* Kopien lag. Bedingt durch die zwischenzeitlich einsetzende Immunantwort lag die Bakterienlast mit  $10^4$  *traD* Kopien an d33 p.i. deutlich niedriger. Es fand sich zudem kein signifikanter Unterschied zwischen CTLA-4 blockierten und nicht blockierten Mäusen. In Vorversuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass schon eine einmalige Blockade von CTLA-4 an d0 zu einer signifikant gesteigerten Bakterienlast in der Lunge führte. Im Vergleich dazu konnte durch eine dreimalige Blockade von CTLA-4 an d0, 4 und 8 p.i. die Bakterienlast noch einmal weiter gesteigert werden, so dass der Unterschied zwischen  $\alpha$ -CTLA-4 behandelten und nicht behandelten Mäusen noch größer wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Hypothese, dass eine Blockade von CTLA-4 über die Verstärkung der antigenspezifischen T-Zell-Antwort zur Senkung der Bakterienlast führen würde, konnte daher nicht verifiziert werden. Im Gegenteil dazu zeigte eine frühe Blockade mit CTLA-4 eine verstärkte Symptomatik und eine Invasion von  $CD4^+$  T-Zellen in die Lunge, bei einem gleichzeitigen Abfall der  $CD8^+$  T-Zellen, die zudem eine verminderte Aktivität aufwiesen. Ein Einfluss der CTLA-4 Blockade auf die  $IFN\gamma^-$ ,  $TNF\alpha^-$  und  $IL-2$ -Zytokinproduktion von T-Zellen konnte ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). In der Summe führten die durch die frühe CTLA-4 Blockade induzierten immunologischen Veränderungen zu einer erhöhten Bakterienlast in der Lunge. Die Daten lassen vermuten, dass eine CTLA-4-abhängige negative Kostimulation von T-Zellen während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* zur effizienten Bekämpfung der Bakterien benötigt wird. Dies ist überraschend und steht im Gegensatz zu vielen anderen Modellen.

#### 4.2.2 Blockade von PD-1 während der akuten und chronischen Phase der Infektion im Vergleich

Bei Barber *et al.* hatte eine Blockade mit PD-1 den Effekt, eine gesteigerte Immunantwort während einer Infektion mit LCMV verbunden mit einer reduzierten Viruslast auszulösen [186]. Zwar konnte in den Abbildungen 4.6 und 4.7 bereits gezeigt werden, dass PD-1 während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* quantitativ eine geringere Rolle als CTLA-4 spielt, trotzdem besteht die Möglichkeit, dass gerade der geringe Anteil an PD-1 noch ausreicht, um eine vollständige Abwehr der Bakterienlast zu verhindern. Um zu überprüfen, ob vielleicht eine Blockade mit PD-1, im Gegensatz zu CTLA-4, zu einer Verminderung der Bakterienlast bei einer *O. tsutsugamushi* Infektion führt, wurde nachfolgend PD-1 wie schon bei der Blockade von CTLA-4 sowohl während der akuten als auch während der chronischen Phase der Infektion *in vivo* blockiert. Dazu wurden zunächst C57BL/6 Weibchen sc./id. in die rechte Hinterpfote mit 25.000 *sfu* infiziert (siehe Abbildung 4.13).



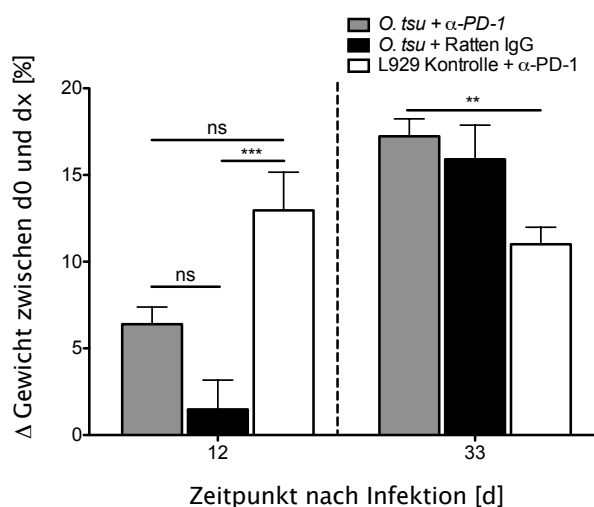
**Abbildung 4.13: Versuchsablauf der PD-1 Blockade in der akuten sowie in der chronischen Phase der Infektion.** Dargestellt ist der Versuchsablauf von zwei unabhängigen Experimenten. Für beide Experimente wurden C57BL/6 Weibchen an d0 mit 25.000 *sfu* *O. tsutsugamushi* (*O. tsu*) sc./id. in die rechte Hinterpfote infiziert. Einerseits erhielten die infizierten Mäuse während der frühen Blockade (akute Phase) eine dreimalige ip. Injektion von jeweils 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1 (Klon RPM1-14) in PBS in einem Gesamtvolumen von 250  $\mu$ L an d0, 4 und 8 p.i.. An d12 p.i. erfolgte eine Untersuchung der Lunge auf ihre Bakterienlast (*traD* qPCR) und den Aktivierungsstatus der T-Lymphozyten mittels durchflusszytometrischer Analysen. In einem zweiten Experiment erhielten die infizierten Mäuse eine dreimalige späte Blockade (chronische Phase) durch ip. Injektionen von jeweils 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1 (Klon RPM1-14) an d21, 25 und 29 p.i., woraufhin an d33 p.i. ebenfalls eine Untersuchung der Lunge erfolgte. Als Kontrollgruppen dienten in beiden Experimenten ebenfalls *O. tsu* infizierte Mäuse, die jedoch anstelle der  $\alpha$ -CTLA-4 Behandlung 250  $\mu$ g Ratten IgG in PBS erhielten.

Analog zu dem im Kapitel 4.2.1 beschriebenen Experiment zur CTLA-4 Blockade wurde auch das Experiment zur PD-1 Blockade durchgeführt. Dazu wurden anstelle des CTLA-4 Antikörpers 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1 dreimalig entweder während der akuten Phase oder während

der chronischen Phase der Infektion ip. injiziert. An den Analysezeitpunkten d12 bzw. d33 p.i. erfolgte einerseits eine Untersuchung der Bakterienlast in der Lunge mittels *traD* qPCR und andererseits die durchflusszytometrische Analyse der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten auf ihren Aktivierungsstatus und ihre Zytokinproduktion hin.

#### 4.2.2.1 Unveränderte Symptomatik nach früher PD-1 Blockade

Auch nach der PD-1 Blockade wurde zunächst der Gesundheitszustand der infizierten und  $\alpha$ -PD-1 behandelten Mäuse im Vergleich zu den infizierten und nicht blockierten Mäusen festgestellt (siehe Abbildung 4.14).



**Abbildung 4.14: Mausgewicht nach früher und später Blockade von PD-1.**

Mit *O. tsutsugamushi* infizierte C57BL/6 Mäuse wurden mit jeweils 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1 (*O. tsu* +  $\alpha$ -PD-1) bzw. Ratten IgG (*O. tsu* + Ratten IgG) ip. behandelt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Mäuse, die ebenfalls mit  $\alpha$ -PD-1 behandelt wurden (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -PD-1). Gezeigt ist die Gewichtsänderung zwischen d0 und d12 (links) bzw. d33 (rechts) p.i. in %. Dargestellt ist jeweils eines von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; d12: n=8; d33: n=5). \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, ns = nicht signifikant; d12: One Way ANOVA mit Bonferroni Korrektur; d33: Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *post test*.

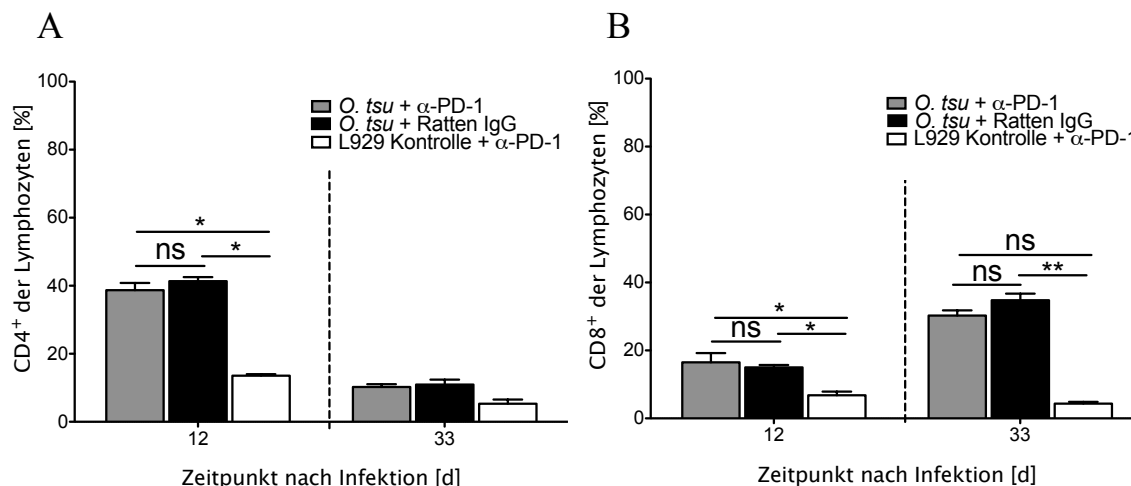
Sowohl nach der frühen als auch nach der späten Blockade von PD-1 zeigten die infizierten Mäuse (*O. tsu* +  $\alpha$ -PD-1) zwischen d0 und d12 p.i. (links) bzw. d33 p.i. (rechts) keine signifikante Gewichtsveränderung im Vergleich zu den infizierten nicht  $\alpha$ -PD-1 behandelten Mäusen (*O. tsu* + Ratten IgG). Eine frühe Blockade von PD-1 hatte demnach während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* keinen erkennbaren Einfluss auf die Symptomatik. An d33 p.i. lag jedoch das Gewicht der nicht infizierten, aber  $\alpha$ -PD-1 behandelten Mäuse, unter dem Gewicht der infizierten Mäuse, was ggf. auf die Behandlung mit  $\alpha$ -PD-1 zurückzuführen ist.

#### 4.2.2.2 Unveränderte Anzahl von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten nach PD-1 Blockade

Neben den äußerlichen Krankheitssymptomen wurden auch nach der PD-1 Blockade die T-Lymphozyten der Lunge durchflusszytometrisch untersucht, um mögliche Einflüsse der Blockade auf das Immunsystem nachzuweisen. Dafür wurden isolierte Lungenzellen infi-



zierter mit  $\alpha$ -PD-1 (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1) bzw. Ratten IgG (*O.tsu* + Ratten IgG) behandelte Mäuse sowie nicht infizierter aber blockierter Mäuse (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -PD-1) zunächst mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. In Abbildung 4.15 sind die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in % aller Lymphozyten nach früher und später Blockade dargestellt.



**Abbildung 4.15: CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge nach früher und später PD-1 Blockade.** C57BL/6 Mäuse wurden mit 25.000 *sfu* *O. tsutsugamushi* infiziert und zu frühen (d0, 4 und 8 p.i.) bzw. späten (d21, 25 und 29 p.i.) Zeitpunkten mit jeweils 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1 (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1) bzw. 250  $\mu$ g Ratten IgG (*O.tsu* + Ratten IgG) ip. behandelt. Als Kontrollgruppe dienten nicht infizierte aber blockierte Mäuse (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -PD-1). An d12 bzw. d33 p.i. wurden Lungenzellen isoliert und mit Antikörpern gegen CD4 (APC-Cy7; A) und CD8 (PerCPCy5.5; B) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup> (A) und CD8<sup>+</sup> (B) T-Zellen in % aller Lymphozyten. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5). \*p<0,05, \*\*p<0,01, ns = nicht signifikant; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *post test*.

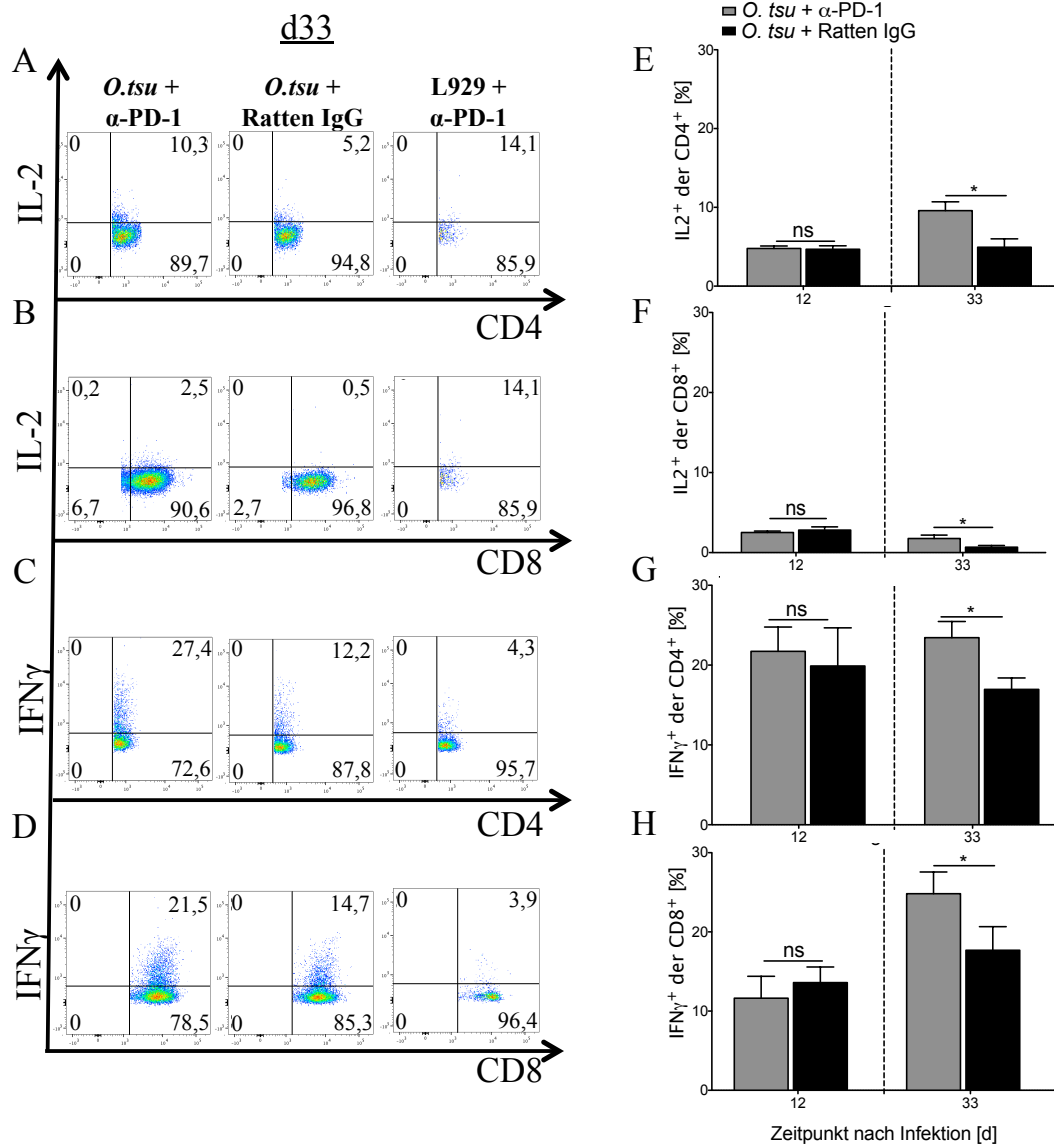
Während sich nach einer Blockade von CTLA-4 ein signifikant höherer Anteil von CD4<sup>+</sup> im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen am Lymphozyten-Kompartiment nachweisen ließ (siehe Abbildung 4.10), veränderte eine Blockade von PD-1 das Verhältnis weder während der frühen noch während der späten Phase der Infektion (siehe Abbildung 4.15). Eine Blockade von PD-1 hatte demnach auf das Gleichgewicht der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* keinen Einfluss.

#### 4.2.2.3 PD-1 Blockade steigert die Produktion von den Zytokinen IFN $\gamma$ und IL-2 in der chronischen Phase der Infektion

Die PD-1 Blockade zeigte keinen Einfluss auf das Gleichgewicht von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Um zu sehen, ob eine Blockade von PD-1 einen Einfluss auf den Aktivierungsstatus der T-Lymphozyten hat, wurde eine Analyse ihres Phänotypes anhand der Marker KLRG1, CD11a, CD44, CD62L und GrzB durchgeführt. Im Gegensatz zur frühen CTLA-4 Blockade, die eine reduzierte Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge während einer *O. tsutsugamushi* Infektion induzierte (siehe Abbildung 4.11), hatte die PD-1 Blockade weder während der akuten noch während der chronischen Phase einen Einfluss auf die Aktivierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob eine PD-1 Blockade jedoch die Zytokinproduktion in der Lunge

beeinflusst, wurden isolierte Lungenzellen aus infizierten Mäusen, die mit  $\alpha$ -PD-1 (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1) bzw. Ratten IgG (*O.tsu* + Ratten IgG) behandelt wurden sowie nicht infizierte aber blockierte Mäuse (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -PD-1) mit Antikörpern gegen CD4, CD8, IFN $\gamma$  und IL-2 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abbildung 4.16). Bei der statistischen Auswertung wurde allerdings erneut darauf verzichtet die nicht infizierte Mausgruppe aufzunehmen, um mögliche Verfälschungen durch die nur geringe Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu vermeiden. In den Dot Plots (B, D, F, H) wurden sie jedoch der Vollständigkeit halber aufgeführt, um die Ergebnisse zu verdeutlichen.



**Abbildung 4.16: Intrazelluläre Zytokinexpression von IL-2 und IFN $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> pulmonalen T-Zellen nach früher und später PD-1 Blockade.** *O. tsutsugamushi* infizierte C57BL/6 Mäuse wurden mit jeweils 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1 (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1) bzw. Ratten IgG (*O.tsu* + Ratten IgG) entweder während der akuten oder während der chronischen Phase ip. behandelt. An d12 bzw. d33 p.i. wurden Lungenzellen isoliert und mit Antikörpern gegen IL-2 (PE) und IFN $\gamma$  (FITC) nach einer 4 h *in vitro* Restimulation mit PMA/Ionomycin intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IL-2<sup>+</sup> (E, F) und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (G, H) Zellen in % der pulmonalen CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten an d12 bzw. d33 p.i.. In A-D sind exemplarische Dot Plots von d33 p.i. aufgeführt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5). \*p<0,05; ns = nicht signifikant; Mann Whitney-Test (zweiseitig).

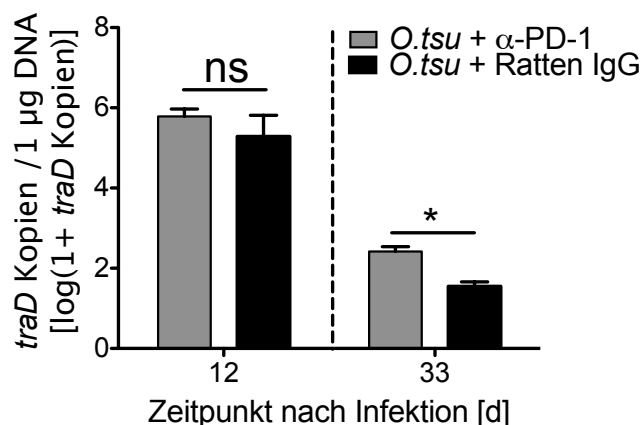
Nach der akuten Blockade von PD-1 konnte an d12 p.i. kein Unterschied der IL-2- bzw. IFN $\gamma$ -Produktion der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zwischen den infizierten und  $\alpha$ -PD-1 behandelten (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1) sowie den Ratten IgG (*O.tsu* + Ratten IgG) behandelten Mäusen nachgewiesen werden. Die IL-2-Produktion lag für beide Mausgruppen bei etwa 5 % der CD4<sup>+</sup> (E; links) und bei etwa 3 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (F; links), während die IFN $\gamma$ -Produktion für beide Mausgruppen mit etwa 20 % der CD4<sup>+</sup> und 10 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge nachgewiesen werden konnte. Nach der Blockade in der chronischen Phase konnten bei den infizierten nicht blockierten Mäusen an d33 p.i. 5 % der CD4<sup>+</sup> (A; E, rechts) und 0,5 % der CD8<sup>+</sup> (B; F, rechts) T-Lymphozyten positiv für IL-2 gemessen werden.

Eine späte Blockade mit  $\alpha$ -PD-1 führte sowohl bei den CD4<sup>+</sup> als auch bei den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu einem Anstieg der IL-2-Produktion. Nach der Blockade waren 10 % der CD4<sup>+</sup> (E; rechts) und etwa 2 % der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge IL-2<sup>+</sup> (F, rechts). Auch die IFN $\gamma$ -Produktion konnte nach einer Blockade von PD-1 während der chronischen Phase an d33 p.i. im Vergleich zu den nicht  $\alpha$ -PD-1 behandelten Mäusen signifikant erhöht nachgewiesen werden. Nach der späten Blockade produzierten 25 % der CD4<sup>+</sup> (C; G, rechts) und 25 % der CD8<sup>+</sup> infizierten Lungenzellen (D; H, rechts) IFN $\gamma$ , während das IFN $\gamma$ -Level bei nicht blockierten Lungenzellen sowohl bei CD4<sup>+</sup> als auch bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei etwa 17 % lag.

Während eine Blockade von CTLA-4 weder zum frühen noch zum späten Zeitpunkt einen Einfluss auf die IL-2- bzw. IFN $\gamma$ -Produktion in der Lunge hatte, führte eine späte Blockade von PD-1 zu einem Anstieg der IL-2- und IFN $\gamma$ -Produktion der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. IL-2 ist für die T-Zell-Proliferation verantwortlich und IFN $\gamma$  verschiebt als Typ 2 Interferon das Gleichgewicht der T<sub>h</sub>1/T<sub>h</sub>2-Antwort in Richtung einer T<sub>h</sub>1-Antwort. Da es gleichzeitig für eine Aktivierung der Makrophagen zur Vernichtung von intrazellulären Bakterien sorgt, wäre anzunehmen, dass die erhöhte Zytokinsekretion auch zu einer stärkeren antibakteriellen Abwehr, ausgelöst durch eine späte Blockade von PD-1, führt.

#### 4.2.2.4 Erhöhte Bakterienlast in der Lunge nach später PD-1 Blockade

Eine Blockade von PD-1 hatte weder einen Einfluss auf das Gleichgewicht von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Abbildung 4.15) noch auf den Aktivierungsstatus der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Daten nicht gezeigt) in der Lunge. Eine Blockade von PD-1 während der chronischen Phase hatte jedoch einen Anstieg der IL-2- und IFN $\gamma$ -Zytokinproduktion (siehe Abbildung 4.16) der T-Lymphozyten in der Lunge zur Folge. Um zu überprüfen, ob schon diese immunologische Veränderung zu einer verminderten Bakterienlast führt, wurde die *traD* Kopienzahl in der Lunge der infizierten und  $\alpha$ -PD-1 behandelten (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1) sowie der infizierten aber nicht blockierten Mäuse (*O.tsu* + Ratten IgG) mittels *traD* qPCR ermittelt (siehe Abbildung 4.17).



**Abbildung 4.17: Bakterienlast in der Lunge nach früher und später PD-1 Blockade.**

In Lungen aus infizierten und  $\alpha$ -PD-1 behandelten C57BL/6 Mäusen (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1) wurden im Vergleich zu infizierten aber nicht  $\alpha$ -PD-1 behandelten (*O.tsu* + Ratten IgG) Mäusen mittels *traD* qPCR die Bakterienlasten gemessen. Dargestellt sind die *traD* Kopien pro 1  $\mu$ g DNA an d12 p.i. nach früher Blockade von PD-1 (links) und an d33 p.i. nach später Blockade von PD-1 (rechts). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5). \*p<0,05; ns = nicht signifikant; Mann Whitney-Test (zweiseitig).

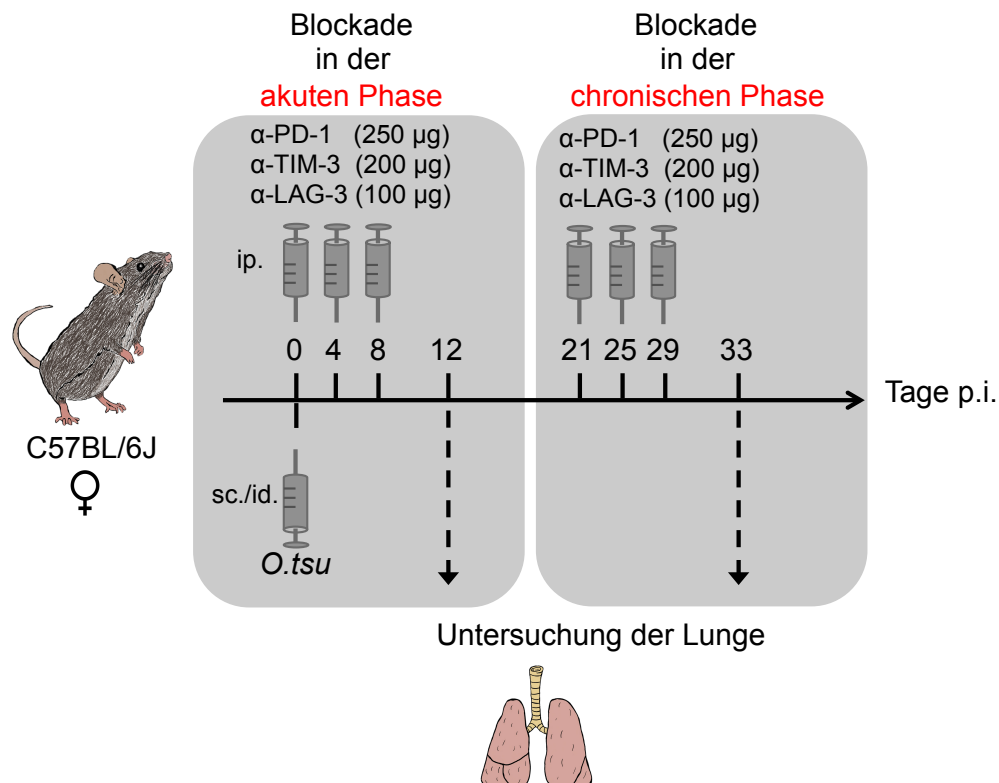
An d12 p.i. konnten in der Lunge etwa  $10^5$ - $10^6$  *traD* Kopien pro 1  $\mu$ g DNA sowohl in den infizierten und  $\alpha$ -PD-1 (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1) behandelten als auch in den nicht blockierten Mäusen (*O.tsu* + Ratten IgG) nachgewiesen werden. In den Lungen von infizierten, aber nicht behandelten Mäusen konnten an d33 p.i. lediglich ca.  $10^2$  *traD* Kopien pro 1  $\mu$ g DNA detektiert werden. Eine Blockade von PD-1 während der chronischen Phase führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg der Bakterienlast in der Lunge auf etwa  $10^3$  *traD* Kopien pro 1  $\mu$ g DNA.

Entgegen der Erwartungen konnte eine Blockade von PD-1 weder während der akuten noch während der chronischen Phase der Infektion zu einer gesteigerten Effektorfunktion der T-Lymphozyten, verbunden mit einer verminderten Bakterienlast in der Lunge, erreichen. Eine Blockade von PD-1 während der chronischen Phase führte lediglich zu einer gesteigerten Zytokinproduktion von IL-2 und IFN $\gamma$  in den T-Lymphozyten. Doch diese immunologische Veränderung alleine scheint nicht auszureichen, um die Bakterienlast während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* zu reduzieren. Im Gegenteil dazu führte eine späte Blockade von PD-1 sogar zu einer gesteigerten Bakterienlast während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi*. So scheint auch PD-1 eine Rolle bei der Bekämpfung von *O. tsutsugamushi* zu spielen. Auch diese Beobachtung steht im Gegensatz zu gegenwärtigen Modellvorstellungen zur Rolle von PD-1 als negativem T-Zell-Kostimulator bei Infektionen.

#### 4.2.3 Kombinierte Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 während der akuten und chronischen Phase der Infektion im Vergleich

Da auch eine Blockade von PD-1 alleine einen steigernden Effekt auf die Bakterienlast während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* hatte, wurde nun auf eine Blockade mit PD-1 in Kombination mit anderen Regulatoren zurückgegriffen. McMahan *et al.* zeigte zum Beispiel diesbezüglich, dass eine kombinierte Blockade von PD-1 mit TIM-3 die T-Zell-

Proliferation bei einer Hepatitis C Infektion steigern kann [265]. Zudem wurde in Kapitel 4.7 gezeigt, dass TIM-3 sehr stark von CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wurde, so dass möglicherweise eine Blockade von PD-1 in Kombination mit TIM-3 den vermuteten Effekt einer verringerten Bakterienlast erzielt. Woo *et al.* konnten durch eine kombinierte Blockade von PD-1 mit LAG-3 eine gesteigerte adaptive Immunantwort gegen einen Tumor herbeiführen [266]. Die Ergebnisse führten zu der Entscheidung, eine kombinierte Blockade von PD-1 in Kombination sowohl mit TIM-3 als auch mit LAG-3 durchzuführen. Dafür wurden zunächst C57BL/6 Weibchen *sc./id.* in die rechte Hinterpfote mit 25.000 *sfu* infiziert (siehe Abbildung 4.18).

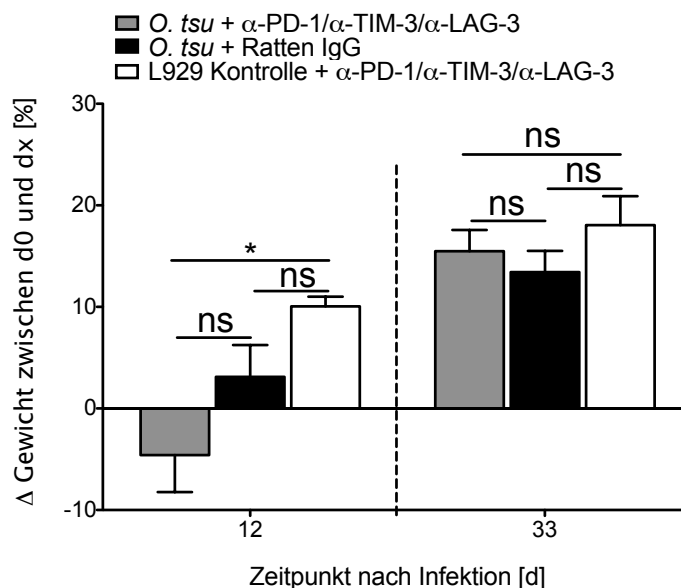


**Abbildung 4.18: Versuchsablauf der frühen und späten kombinierten Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3.** Dargestellt ist der Versuchsablauf von zwei unabhängigen Experimenten. Für beide Experimente wurden C57BL/6 Weibchen an d0 mit 25.000 *sfu* *O. tsutsugamushi* (*O.tsu*) *sc./id.* in die rechte Hinterpfote infiziert. Einerseits erhielten die infizierten Mäuse während der akuten Blockade eine dreimalige *ip.* Injektion von jeweils 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1 (Klon RMP1-14), 200  $\mu$ g  $\alpha$ -TIM-3 (Klon RMT3-23) und 100  $\mu$ g  $\alpha$ -LAG-3 (Klon C9B7W) in PBS in einem Gesamtvolumen von 250  $\mu$ L an d0, 4 und 8 *p.i.*. An d12 *p.i.* erfolgte eine Untersuchung der Lunge auf ihre Bakterienlast (*traD* qPCR) und den Aktivierungsstatus der T-Lymphozyten mittels durchflusszytometrischer Analysen. In einem zweiten Experiment erhielten die infizierten Mäuse eine dreimalige späte Blockade (chronisch) durch *ip.* Injektionen von jeweils 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1 (Klon RMP1-14), 200  $\mu$ g  $\alpha$ -TIM-3 (Klon RMT3-23) und 100  $\mu$ g  $\alpha$ -LAG-3 (Klon C9B7W) an d21, 25 und 29 *p.i.*, woraufhin an d33 ebenfalls eine Untersuchung der Lunge erfolgte. Als Kontrollgruppen dienten in beiden Experimenten ebenfalls *O.tsu* infizierte Mäuse, die jedoch eine Ratten IgG Behandlung erhielten.

Entsprechend der bisher durchgeführten Blockadeexperimente von PD-1 bzw. CTLA-4 wurden die Mäuse in diesen Experimenten mit einer kombinierten Antikörpermischung aus PD-1, TIM-3 und LAG-3 entweder während der akuten oder während der chronischen Phase der Infektion behandelt. Anschließend wurde die Lunge an d12 bzw. d33 *p.i.* auf ihre Bakterienlast sowie auf den Aktivierungsstatus und die Zytokinproduktion der T-Lymphozyten untersucht.

#### 4.2.3.1 Unveränderte Symptomatik nach kombinierter Blockade

Auch nach der kombinierten Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 wurde zunächst der Gesundheitsstatus der infizierten und blockierten Mäuse im Vergleich zu nur infizierten Mäusen anhand der Gewichtsreduktion während einer *O. tsutsugamushi* Infektion ermittelt (siehe Abbildung 4.19).



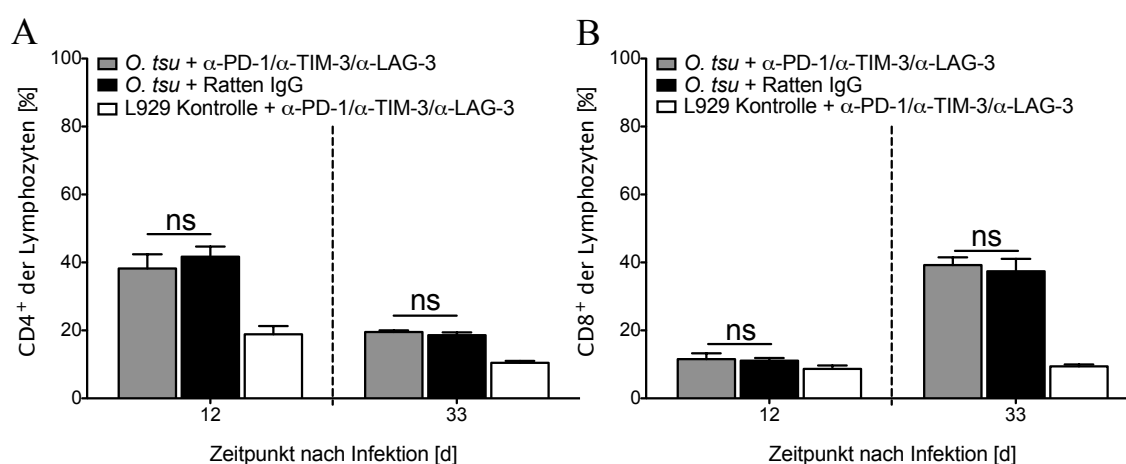
**Abbildung 4.19: Mausgewicht nach früher und später kombinierter Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3.** Mit *O. tsutsugamushi* infizierte C57BL/6 Mäuse wurden mit jeweils 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1, 200  $\mu$ g  $\alpha$ -TIM-3 und 100  $\mu$ g  $\alpha$ -LAG-3 (*O. tsu* +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3) bzw. Ratten IgG (*O. tsu* + Ratten IgG) ip. behandelt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Mäuse, die ebenfalls mit der Antikörperkombination behandelt wurden (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3). Die Behandlung erfolgte entweder während der akuten oder während der chronischen Phase der Infektion, woraufhin das Gewicht an d12 bzw. d33 p.i. ermittelt wurde. Gezeigt ist die Gewichtsänderung zwischen d0 und d12 (links) bzw. d33 (rechts) p.i. in %. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5). \* $p < 0,05$ , ns = nicht signifikant; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *post test*.

Nach der frühen Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 zeigten die infizierten Mäuse (*O. tsu* +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3) an d12 p.i. im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht an d0 p.i. eine Gewichtsabnahme von etwa 5 %. Die nicht blockierte aber infizierte Gruppe (*O. tsu* + Ratten IgG) zeigte hingegen eine geringe Gewichtszunahme von etwa 3 % im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht an d0 p.i.. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Für die nicht infizierte Kontrollgruppe (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3) konnte an d12 p.i. eine Gewichtszunahme von 10 % im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht ermittelt werden. Nach einer späten kombinierten Blockade konnte kein Gewichtsunterschied zwischen den Mausgruppen festgestellt werden. Alle Gruppen zeigten an d33 p.i. eine Gewichtszunahme von etwa 15 % im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht an d0 p.i..

Eine kombinierte Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Gewicht im Vergleich zu den mit *O. tsutsugamushi* infizierten aber nicht blockierten Mäusen.

#### 4.2.3.2 Unveränderte Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach kombinierter Blockade

Um zu überprüfen, ob eine kombinierte Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 während einer *O. tsutsugamushi* Infektion einen immunologischen Einfluss hat, wurden Lymphozytenpopulationen der Lunge zunächst auf ihre relativen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Anteile hin untersucht. Dafür wurden isolierte Lungenzellen infizierter und mit der Antikörperkombination behandelter Mäuse (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3), infizierter und nicht blockierter Mäuse (*O.tsu* + Ratten IgG) sowie nicht infizierter aber blockierter Mäuse (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3) mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. In Abbildung 4.20 sind die CD4<sup>+</sup> (A) und CD8<sup>+</sup>(B) T-Zellen in % aller Lymphozyten der Lunge an d12 p.i. nach früher bzw. an d33 p.i. nach später Blockade dargestellt.



**Abbildung 4.20: CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lunge nach früher und später kombinierter Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3.** *O. tsutsugamushi* infizierte C57BL/6 Mäuse wurden mit jeweils 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1, 200  $\mu$ g  $\alpha$ -TIM-3 und 100  $\mu$ g  $\alpha$ -LAG-3 (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3) bzw. Ratten IgG (*O.tsu* + Ratten IgG) ip. entweder während der akuten oder der chronischen Phase behandelt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte aber blockierte Mäuse (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3). Die isolierten Lungenzellen wurden an d12 p.i. bzw. d33 p.i. mit Antikörpern gegen CD4 (APC-Cy7) und CD8 (PerCPCy5.5) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup> (A) und CD8<sup>+</sup> (B) T-Zellen in % aller pulmonalen Lymphozyten. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5). ns = nicht signifikant; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *post test*.

Die Auswertung der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Lunge ergab sowohl nach einer frühen als auch nach einer späten kombinierten Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 keinen Expressionsunterschied im Vergleich zu den infizierten aber nicht blockierten Mäusen. An d12 p.i. zeigten beide infizierten Gruppen 40 % CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, während an d33 p.i. die Expression nur noch bei etwa 20 % lag. Auch für den relativen Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte kein Unterschied zwischen den früh bzw. spät blockierten Mäusen und den nicht blockierten Mäusen gezeigt werden. Bei beiden Mausgruppen waren an d12 p.i. etwa 10 % und an d33 p.i. etwa 40 % der Lungenzellen positiv für CD8 zu messen.

Eine Blockade von PD-1 in Kombination mit TIM-3 und LAG-3 zeigte demnach weder während der akuten noch während der chronischen Phase einen Einfluss auf das Gleichgewicht von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge. Auch eine Untersuchung der T-Lymphozyten auf ihren Aktivierungsstatus, gemessen an den Markern KLRG1, CD11a,

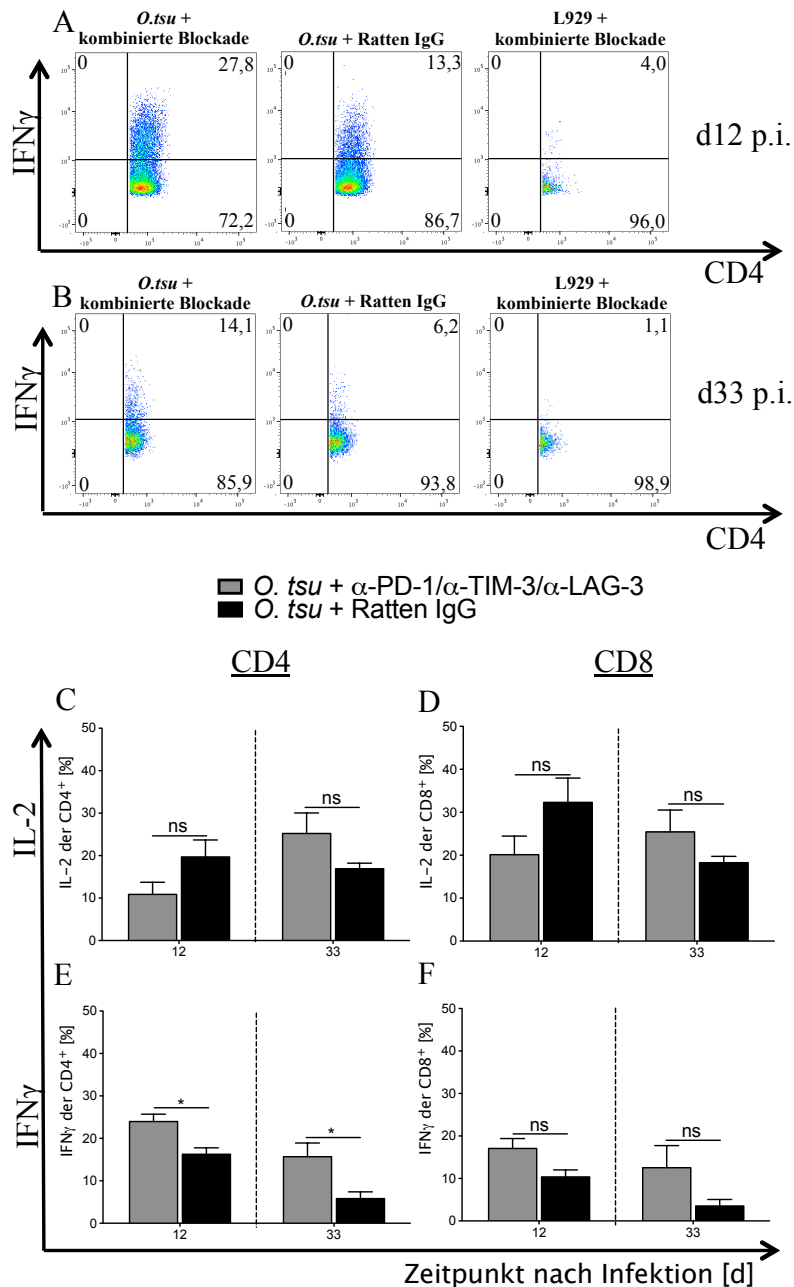
---

CD44, CD62L und GrzB (Daten nicht gezeigt), zeigte keinen Unterschied nach einer kombinierten Blockade.

#### **4.2.3.3 Frühe und späte kombinierte Blockade steigert die IFN $\gamma$ -Produktion auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nicht aber die Produktion von IL-2**

Für eine Blockade von PD-1 ohne TIM-3 und LAG-3 während der chronischen Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion konnte bereits eine gesteigerte IL-2- und IFN $\gamma$ -Produktion der CD4<sup>+</sup> sowie der CD8<sup>+</sup> pulmonalen T-Lymphozyten gezeigt werden (siehe Abbildung 4.16). Um zu sehen, ob auch nach einer kombinierten Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 eine Veränderung des Zytokinmilieus hervorgerufen wird, wurden Lungenzellen von infizierten und blockierten (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3) sowie infizierten und nicht blockierten Mäusen (*O.tsu* + Ratten IgG) an d12 p.i. bzw. d33 p.i. isoliert. Die Zellen wurden für 4 h *in vitro* mit PMA und Ionomycin restimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4, CD8, IFN $\gamma$ , IL-2 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abbildung 4.21).





**Abbildung 4.21: IFN $\gamma$ - und IL-2-Zytokinexpression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lungenzellen nach früher und später kombinierter Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3.** *O. tsutsugamushi* infizierte C57BL/6 Mäuse wurden mit einer Kombination aus jeweils 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1, 200  $\mu$ g  $\alpha$ -TIM-3 und 100  $\mu$ g  $\alpha$ -LAG-3 (*O. tsu* +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3) bzw. Ratten IgG (*O. tsu* + Ratten IgG) während der akuten bzw. während der chronischen Phase der Infektion i.p. behandelt. An d12 bzw. d33 p.i. wurden Lungenzellen isoliert und mit Antikörpern gegen CD4 (V500), CD8 (PerCP-Cy5.5), IL-2 (PE) und IFN $\gamma$  (FITC) nach einer 4 h *in vitro* Restimulation mit PMA/Ionomycin gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. In A und B sind exemplarische Dot Plots der IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Färbung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen an d12 p.i. und d33 p.i. gezeigt. (C-F) Dargestellt sind die IL-2<sup>+</sup> (C, D) sowie IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (E, F) Zellen in % der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> pulmonalen T-Lymphozyten an d12 bzw. d33 p.i.. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5). \*p<0,05, ns = nicht signifikant; Mann Whitney-Test (zweiseitig).

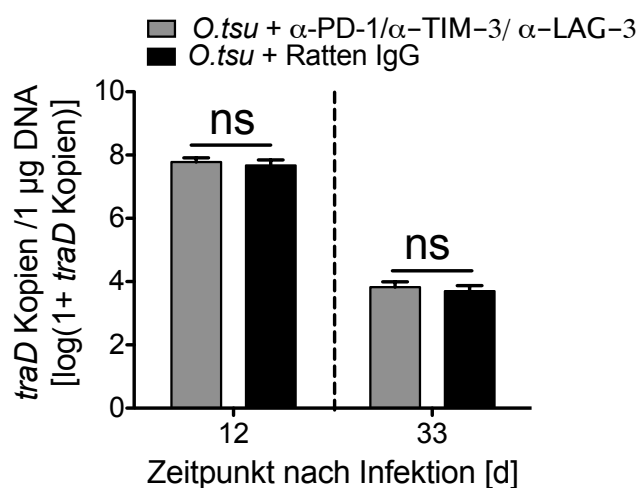
Die IL-2-Produktion zeigte sowohl bei CD4<sup>+</sup> (C) als auch auf CD8<sup>+</sup> (D) pulmonalen T-Lymphozyten weder nach einer frühen noch nach einer späten kombinierten Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den nicht blockierten Mäusen. Die IFN $\gamma$ -Produktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A, B, E) konnte hingegen sowohl durch eine frühe als auch durch eine späte kombinierte Blockade signifikant erhöht

werden. An d12 p.i. konnte in den blockierten Mäusen eine  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion von etwa 25 % gezeigt werden, während in den nicht blockierten Mäusen lediglich 15 % der  $\text{CD4}^+$  Lungenzellen  $\text{IFN}\gamma$  produzierten. An d33 p.i. konnten für die  $\text{CD4}^+$  T-Zellen 15 % für die mit der Antikörperkombination behandelten Mäuse und 5 % für die nicht blockierten Mäuse positiv für  $\text{IFN}\gamma$  gemessen werden. Die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen (F) blieb auch nach einer kombinierten Blockade sowohl während der akuten als auch während der chronischen Phase im Vergleich zu den nicht blockierten Mäusen unverändert.

Durch die kombinierte Blockade konnte zwar die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion der  $\text{CD4}^+$  T-Zellen gesteigert werden, nicht aber die Produktion von IL-2.

#### 4.2.3.4 Unveränderte Bakterienlast in der Lunge nach früher und später kombinierter Blockade

Nach der kombinierten Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 konnten keine immunologischen Veränderungen im Gleichgewicht der T-Lymphozyten (siehe Abbildung 4.20) und deren Aktivierungsstatus nachgewiesen werden. In Kapitel 4.2.3.3 konnte lediglich eine erhöhte  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion der pulmonalen  $\text{CD4}^+$  T-Zellen durch eine kombinierte Blockade ausgelöst werden. Um zu untersuchen, ob diese erhöhte  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion einen möglichen Einfluss auf die Bakterienlast in der Lunge während einer *O. tsutsugamushi* Infektion hatte, wurde die *traD* Kopienzahl der Lunge mittels qPCR bestimmt. Dazu wurden Lungen aus infizierten und blockierten (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3) bzw. infizierten und nicht blockierten Mäusen (*O.tsu* + Ratten IgG) an d12 p.i. bzw. d33 p.i. isoliert und ihre *traD* Kopienzahl pro 1  $\mu\text{g}$  DNA analysiert. Die Ergebnisse nach einer Blockade während der akuten sowie während der chronischen Phase sind in Abbildung 4.22 dargestellt.



**Abbildung 4.22: Bakterienlast in der Lunge nach früher und später kombinierter Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3.** Lungen aus *O. tsutsugamushi* infizierten und mit einer Kombination aus 250  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -PD-1, 200  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -TIM-3 und 100  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -LAG-3 behandelten C57BL/6 Mäusen (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3) wurden im Vergleich zu infizierten aber nicht blockierten (*O.tsu* + Ratten IgG) Mäusen mittels qPCR auf das *traD* Gen hin überprüft. Dargestellt sind die *traD* Kopien pro 1  $\mu\text{g}$  DNA an d12 p.i. nach früher kombinierter Blockade (links) und an d33 p.i. nach später Blockade (rechts). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n=5$ ). ns = nicht signifikant; Mann Whitney-Test (zweiseitig) *post test*.

Wie in Abbildung 4.22 zu sehen, hatte die kombinierte Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 auch auf die Bakterienlast in der Lunge keinen Einfluss. Sowohl für die infizierten und mit der Antikörperkombination behandelten Mäuse als auch für die infizierten und nicht blockierten Mäuse konnte an d12 p.i. eine *traD* Kopienzahl von etwa  $10^8$  pro 1  $\mu\text{g}$  DNA nachgewiesen werden. An d33 p.i. lag die *traD* Kopienzahl für beide untersuchten Mausgruppen bei etwa  $10^4$  pro 1  $\mu\text{g}$  DNA.

Eine kombinierte Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 hatte demnach keinen Einfluss auf die Bakterienlast in der Lunge während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi*.

#### 4.2.4 Gegenüberstellung der Ergebnisse der verschiedenen Blockadeexperimente

Zur Verdeutlichung sind die Ergebnisse der Kapitel 4.2.1, 4.2.2 und 4.2.3 in Abbildung 4.23 noch einmal graphisch gegenübergestellt.

Untersuchte Parameter	BLOCKADE von...					
	CTLA-4		PD-1		PD-1/TIM-3/LAG-3	
	akute Phase	chron. Phase	akute Phase	chron. Phase	akute Phase	chron. Phase
Gewicht	↓	=	=	=	=	=
CD4 <sup>+</sup>	↑	=	=	=	=	=
CD8 <sup>+</sup>	↓	=	=	=	=	=
Aktivierung CD8 <sup>+</sup>	↓	=	=	=	=	=
IFN $\gamma$	=	=	=	↑	↑	↑
IL-2	=	=	=	↑	=	=
Bakterienlast	↑	=	=	↑	=	=

**Abbildung 4.23: Ergebnisgegenüberstellung der verschiedenen Blockadeexperimente.**

Dargestellt sind die Ergebnisse der verschiedenen Experimente dieser Arbeit, bei denen CTLA-4, PD-1 oder PD-1 in Kombination mit TIM-3 und LAG-3 entweder während der akuten Phase oder während der chronischen (chron.) Phase der Infektion *in vivo* blockiert wurden. Pfeil nach unten/oben = Abnahme/Zunahme des untersuchten Parameters nach der Blockade im Vergleich zu der infizierten aber nicht blockierten Kontrollgruppe; = weist auf keine Veränderung des untersuchten Parameters hin.

### 4.3 Eine gesteigerte Bakterienlast korreliert während einer *Orientia tsutsugamushi* Infektion mit einer erhöhten IL-10-Produktion

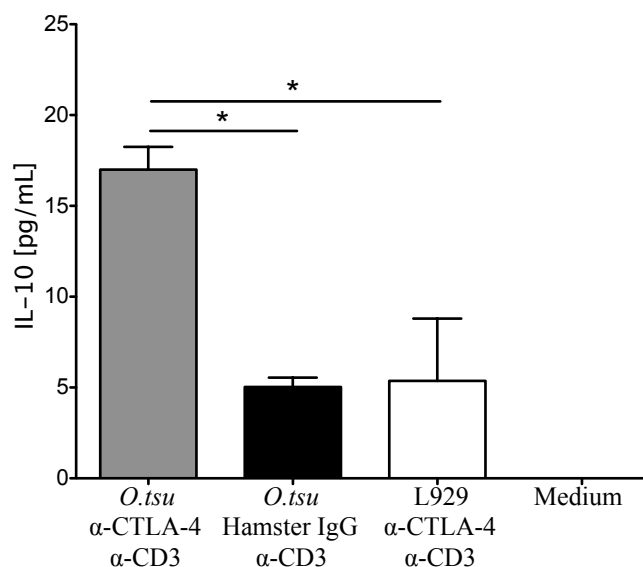
Die bisherigen Beobachtungen entsprachen nicht der Hypothese und widersprechen den gegenwärtigen Modellvorstellungen zur Rolle der negativen Kostimulatoren. Entgegen der Erwartungen führte eine Blockade der untersuchten negativen Korezeptoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 bei einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* nicht zu einer gesteigerten

T-Zell-Effektorantwort mit einer verminderten Bakterienlast in der Lunge. Im Gegenteil dazu konnte nach einer CTLA-4 Blockade während der akuten Phase (siehe Kapitel 4.2.1.4) sowie nach einer PD-1 Blockade (siehe Kapitel 4.17) während der chronischen Phase sogar eine gesteigerte Bakterienlast in der Lunge gezeigt werden. Um eine Ursache für die gesteigerte Bakterienlast nach der Blockade von PD-1 bzw. CTLA-4 zu finden, wurde schließlich das anti-inflammatorische Zytokin IL-10, das u. a.  $\text{IFN}\gamma$ , IL-2 und  $\text{TNF-}\alpha$  hemmen soll, untersucht [267]. Mege *et al.* konnte bereits zeigen, dass IL-10 die Anfälligkeit des Wirtes für viele intrazelluläre Mikroorganismen erhöht und für die Persistenz von Bakterien wie z.B. *M. tuberculosis* verantwortlich ist [255].

Eine Expression von IL-10 könnte demnach eine Erklärung für die erhöhte Bakterienlast während der *O. tsutsugamushi* Infektion in der Lunge nach einer frühen Blockade von CTLA-4 bzw. einer späten Blockade von PD-1 sein.

#### **4.3.1 Eine frühe Blockade von CTLA-4 induziert eine erhöhte IL-10-Produktion in *in vitro* restimulierten Milzzellen**

Für die Untersuchung der IL-10-Produktion nach der akuten Blockade von CTLA-4 wurden an d12 p.i. Milzzellen aus infizierten und  $\alpha$ -CTLA-4 behandelten (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4), infizierten und nicht blockierten (*O.tsu* + Hamster IgG) und nicht infizierten aber  $\alpha$ -CTLA-4 behandelten (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -CTLA-4) C57BL/6 Mäusen isoliert und *in vitro* mit  $\alpha$ -CD3 für 48 h restimuliert. Die Quantifizierung erfolgte mittels LEGENDplex<sup>TM</sup> Zytokin-Bead-Array (siehe Kapitel 4.24) und anschließender durchflusszytometrischer Messung. In Abbildung 4.24 sind die Ergebnisse der IL-10 Quantifizierung in pg/mL dargestellt.



**Abbildung 4.24: IL-10-Produktion von restimulierten Milzzellen nach akuter Blockade von CTLA-4.** Isolierte Milzzellen aus infizierten und  $\alpha$ -CTLA-4 behandelten (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4), infizierten und nicht blockierten (*O.tsu* + Hamster IgG) sowie nicht infizierten aber blockierten (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -CTLA-4) C57BL/6 Mäusen wurden an d12 p.i. isoliert und *in vitro* für 48 h mit  $\alpha$ -CD3 restimuliert. Des Weiteren ist eine Mediumkontrolle ohne  $\alpha$ -CD3 Stimulation aufgeführt (Medium). Die Konzentration von IL-10 wurde mit dem LEGENDplex<sup>TM</sup> Zytokin-Bead-Array bestimmt. Dargestellt ist die Konzentration von IL-10 in pg/mL. (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3-5). \*p<0,05; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *post test*.

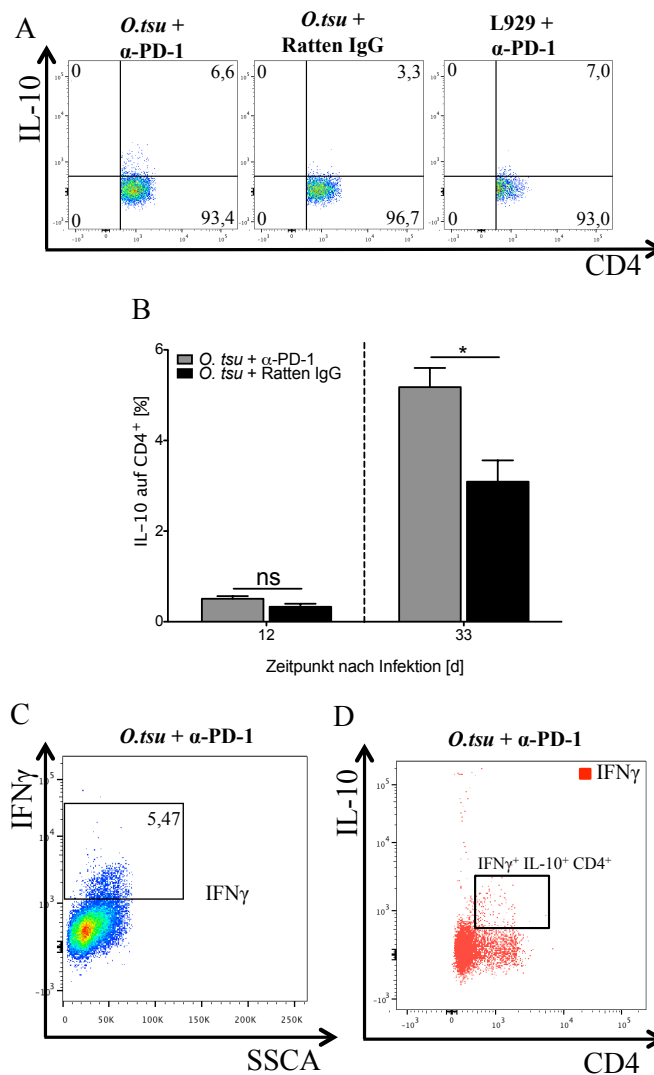
Nach einer Restimulation mit  $\alpha$ -CD3 war sowohl bei den infizierten nicht blockierten Mäusen (*O.tsu* + Hamster IgG +  $\alpha$ -CD3) als auch bei den nicht infizierten aber blockierten Mäusen (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -CTLA-4 +  $\alpha$ -CD3) eine IL-10 Konzentration von etwa 5 pg/mL im Überstand der *in vitro* stimulierten Milzzellen nachweisbar. Nach einer frühen Blockade von CTLA-4 (*O.tsu* +  $\alpha$ -CTLA-4 +  $\alpha$ -CD3) stieg die IL-10 Konzentration bei den infizierten Mäusen signifikant auf etwa 17 pg/mL an.

Es konnte also gezeigt werden, dass T-Zellen in der Milz während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* nach einer frühen *in vivo* Blockade von CTLA-4 und anschließender *in vitro* Restimulation mit  $\alpha$ -CD3 signifikant mehr IL-10 produzieren, als T-Zellen aus der nicht CTLA-4 blockierten Kontrollgruppe. Da IL-10 für seine anti-inflammatorische und T<sub>h</sub>1 hemmende Wirkung bekannt ist und außerdem bei anderen Infektionsmodellen für eine erhöhte Bakterienlast verantwortlich ist, könnte die erhöhte IL-10-Produktion auch eine Erklärung für die erhöhte Bakterienlast (siehe Abbildung 4.12) während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* sein.

#### 4.3.2 Gesteigerte IL-10-Produktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge nach später PD-1 Blockade

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Bakterienlast in der Lunge auch nach der PD-1 Blockade während der chronischen Phase der Infektion in einem Zusammenhang mit einer gesteigerten IL-10-Produktion steht, wie es auch bei der frühen CTLA-4 Blockade gezeigt

werden konnte (siehe Kapitel 4.3.1), wurde erneut die IL-10-Produktion untersucht. Dazu wurden in diesem Fall Lungenzellen von infizierten Mäusen, die mit  $\alpha$ -PD-1 bzw. Ratten IgG während der akuten bzw. chronischen Phase behandelt wurden, isoliert, 4 h *in vitro* mit PMA und Ionomycin restimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen IL-10 und CD4 gefärbt. Die Analyse erfolgte durch eine durchflusszytometrische Messung (siehe Abbildung 4.25).



**Abbildung 4.25: IL-10-Produktion von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten von *O. tsutsugamushi* infizierten C57BL/6 Mäusen nach früher und später PD-1 Blockade.** Mit *O. tsutsugamushi* infizierte C57BL/6 Mäuse wurden dreimalig mit jeweils 250  $\mu$ g  $\alpha$ -PD-1 (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1) bzw. Ratten IgG (*O.tsu* + Ratten IgG) ip. sowohl in der akuten Phase als auch in einem zweiten Experiment in der chronischen Phase behandelt. Als Kontrollgruppe dienten nicht infizierte aber blockierte Mäuse (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -PD-1). Isolierte Lungenzellen wurden mit Antikörpern für 4 h mit PMA/Ionomycin *in vitro* restimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen CD4 (V500), IL-10 (Alexa Fluor 700) und IFN $\gamma$  (FITC) gefärbt. Es folgte eine durchflusszytometrische Messung. (A) Dargestellt sind exemplarische Dot Plots für eine Maus je Gruppe an d33 p.i.. (B) Dargestellt ist die IL-10-Produktion in % der CD4<sup>+</sup> Lungenzellen. (Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5). \*p<0,05, ns = nicht signifikant; Mann Whitney-Test (zweiseitig). (C) Zeigt einen Dot Plot einer infizierten und blockierten Maus (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1), bei der IFN $\gamma$  aller Lymphozyten gezeigt wird. (D) Dargestellt ist ein Dot Plot einer infizierten und blockierten Maus, bei der im Gate die IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen an d33 p.i. dargestellt sind (Kasten).

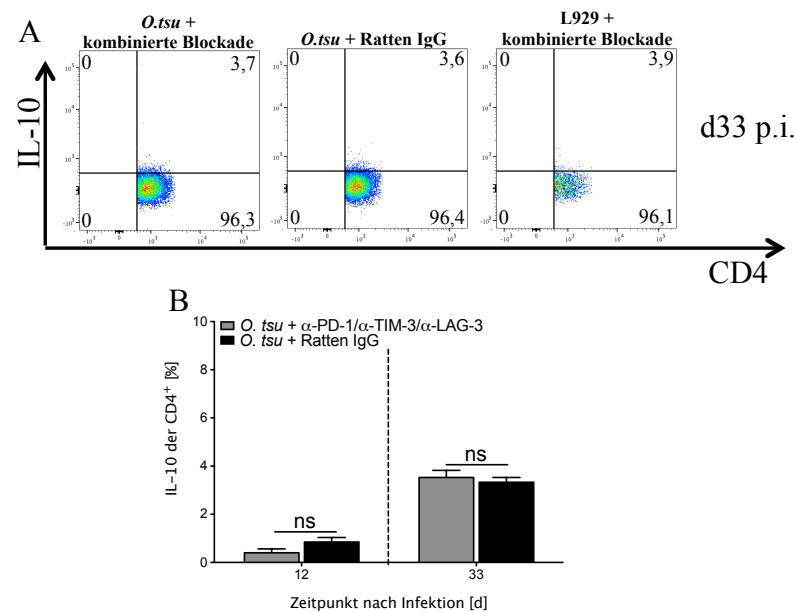
Eine frühe Blockade von PD-1 zeigte an d12 p.i. keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion von CD4<sup>+</sup> Lungenzellen (B; links). Sowohl bei blockierten (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1) als auch nicht blockierten Mäusen (*O.tsu* + Ratten IgG) lag die IL-10-Produktion bei etwa 0,5 % der

CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Eine PD-1 Blockade während der chronischen Phase führte hingegen zu einer signifikant gesteigerten IL-10-Produktion von 5 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu nicht blockierten Mäusen, bei denen 3 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen positiv für IL-10 zu messen waren (A; B, rechts). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht primär nach Zellen geschaut, die zusätzlich zu IL-10 auch weitere Zytokine produzieren, da es nicht Teil der Ausgangshypothese war. Trotzdem konnte im Rahmen dieser Arbeit zumindest qualitativ gezeigt werden, dass die IL-10 produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen gleichzeitig Produzenten für IFN $\gamma$  sind (D; Kasten). Dafür mussten zunächst die IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen aller Lymphozyten (C) definiert werden. Bei den IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> koproduzierenden Zellen handelt es sich jedoch nicht um Produzenten von IL-2 (Daten nicht gezeigt).

Die in Kapitel 4.2.2 aufgeführten Ergebnisse zeigten zwar, dass eine späte Blockade von PD-1 zu einer gesteigerten Zytokinproduktion von IFN $\gamma$  und IL-2 während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* führte. Allerdings konnte trotzdem die Bakterienlast in der Lunge nicht reduziert werden, sondern lag an d33 p.i. sogar erhöht vor. Vergleichbar mit den Ergebnissen nach einer frühen CTLA-4 Blockade konnte auch nach der chronischen Blockade von PD-1 gezeigt werden, dass eine erhöhte Bakterienlast in Verbindung mit einer vermehrten Produktion von IL-10 steht (siehe Abbildung 4.25). Diese IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzierten zudem IFN $\gamma$ . Allerdings müssten für quantitative Aussagen diesbezüglich weitere Untersuchungen folgen.

### 4.3.3 Unveränderte IL-10-Produktion nach einer kombinierten Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3

Um zu sehen, ob auch nach einer kombinierten Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 ohne eine veränderte Bakterienlast in der Lunge eine veränderte IL-10-Produktion vorliegt, oder ob dies ausschließlich der Fall bei einer erhöhten Bakterienlast ist, folgte eine Untersuchung von IL-10 in isolierten Lungenzellen. Dazu wurden *O. tsutsugamushi* infizierte (*O.tsu* +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3) und nicht infizierte Mäuse (L929 Kontrolle +  $\alpha$ -PD-1/ $\alpha$ -TIM-3/ $\alpha$ -LAG-3) während der akuten bzw. chronischen Phase der Infektion mit einer Kombination aus  $\alpha$ -PD-1,  $\alpha$ -TIM-3 und  $\alpha$ -LAG-3 behandelt. An d12 p.i. bzw. d33 p.i. wurden Lungenzellen isoliert und für 4 h *in vitro* mit PMA und Ionomycin restimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4 und IL-10 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abbildung 4.26).



**Abbildung 4.26: IL-10-Zytokinexpression auf CD4<sup>+</sup> Lungenzellen nach früher und später kombinierter Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3.** *O. tsutsugamushi* infizierte C57BL/6 Mäuse wurden mit einer Kombination aus jeweils 250 µg α-PD-1, 200 µg α-TIM-3 und 100 µg α-LAG-3 (*O.tsu* + α-PD-1/α-TIM-3/α-LAG-3) bzw. Ratten IgG (*O.tsu* + Ratten IgG) während der akuten bzw. chronischen Phase der Infektion ip. behandelt. An d12 bzw. d33 p.i. wurden Lungenzellen isoliert und mit Antikörpern gegen CD4 (V500) und IL-10 (Alexa Fluor 700) nach einer 4 h *in vitro* Restimulation mit PMA/Ionomycin gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Gezeigt sind exemplarische Dot Plots der IL-10 Färbung an d33 p.i.. (B) Dargestellt sind die IL-10<sup>+</sup> Zellen in % der CD4<sup>+</sup> pulmonalen T-Zellen an d12 bzw. d33 p.i.. (Mittelwert ± SEM; n=5). ns = nicht signifikant; Mann Whitney-Test (zweiseitig).

Auf die IL-10-Produktion der CD4<sup>+</sup> pulmonalen Zellen hatte die kombinierte Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 weder während der akuten noch während der chronischen Phase der Infektion einen Einfluss. An d12 p.i. lag die IL-10-Produktion in beiden Mausgruppen bei etwa 0,5-1 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. An d33 p.i. stieg die IL-10-Produktion zwar auf etwa 3 % an, blieb jedoch trotzdem unbeeinflusst von einer kombinierten Blockade.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass die nach einer kombinierten Blockade von PD-1, TIM-3 und LAG-3 unveränderte Bakterienlast in der Lunge also einer gleichbleibenden IL-10-Produktion gegenübersteht.

Die zu Beginn der Arbeit aufgestellte Hypothese, dass eine Blockade von negativen Kozeptoren zu einer verstärkten Immunantwort mit einer verminderten Bakterienlast bei einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* führt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch verschiedene einzelne und kombinierte experimentelle Ansätze widerlegt.

Anders als erwartet, führte die Blockade von CTLA-4 während der akuten Phase und die Blockade von PD-1 während der chronischen Phase sogar zu erhöhten Bakterienlasten in der Lunge. Die gezeigte erhöhte Bakterienlast steht dabei jeweils in Korrelation mit einer gesteigerten Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Die Daten aus Kapitel 4.3.2 deuten zudem darauf hin, dass es sich bei den IL-10 produzierenden Zellen nach einer Blockade von PD-1 während der chronischen Phase der Infektion um CD4<sup>+</sup> T-Zellen handelt, die IFN $\gamma$  koproduzieren.



## 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals Informationen über den Einfluss der koinhibitorischen Rezeptoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* ermittelt werden. Das Ziel war, ihren Einfluss auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort sowie deren Folgen für den Infektionsverlauf zu untersuchen. Aufgrund verschiedener Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, in denen eine Blockade inhibitorischer Korezeptoren zu einer gesteigerten T-Zell-Immunantwort mit einer gesteigerten Pathogenabwehr führt, bestand die Arbeitshypothese darin, dass die negative T-Zell-Kostimulation auch bei einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* die Effektorantwort inhibiert und eine entsprechende Blockade zu einer Verbesserung der Pathogenabwehr führt.

### 5.1 Organspezifische Dynamik der T-Zell-Aktivierung

Eine Aktivierung der T-Zellen ist eine Grundvoraussetzung für eine funktionierende Abwehr diverser Pathogene. Während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* als intrazelluläres Bakterium tragen vor allem die CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Abwehr bei [77]. Auch im Rahmen dieser Arbeit lagen die CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowohl relativ als auch absolut während der chronischen Phase der Infektion in der Lunge ab d21 p.i. bzw. absolut sogar ab d12 p.i. signifikant erhöht vor, also auch in der Phase, in der die Bakterienlast bereits wieder abnahm. Eine ähnliche Dynamik konnte auch im Menschen während einer *O. tsutsugamushi* Infektion gezeigt werden, bei denen im Blut die CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch erst in der Rekonvaleszenzphase nachweisbar sind [121]. Nach einer Beendigung einer Infektion ist zu erwarten, dass eine verminderte Expression von Aktivierungsmarkern wie z.B. KLRG1 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar ist [268]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen jedoch nicht nur während der akuten, sondern überraschenderweise auch in der chronischen Phase der Infektion einen überwiegend aktivierten Phänotyp auf. Besonders auffällig war, dass einige der untersuchten Aktivierungsmarker während der akuten und chronischen Phase der Infektion hochreguliert waren (z.B. KLRG1 und CD11a in der Lunge; GrzB in der Milz), während andere wiederum nur während der akuten (GrzB in der Lunge; KLRG1 in der Milz) oder nur während der chronischen Phase (CD62L<sup>-</sup> in der Lunge) erhöht exprimiert vorlagen. Des Weiteren gab es auch Unterschiede zwischen den untersuchten Organen Lunge und Milz. Es scheint demnach einen Unterschied zwischen dem Aktivierungsstatus der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der akuten und chronischen Phase bzw. in unterschiedlichen Organen zu geben. Auf die wichtigsten Auffälligkeiten wird in diesem Kapitel näher eingegangen.

Eine Frage, die es dabei zu klären gilt, ist die Tatsache, warum es überhaupt so viele aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der chronischen Phase gibt, da die Bakterienlast doch

in dieser Phase bereits heruntergeht. Und liegen diese noch stimuliert also funktional vor oder befinden sich diese in einer Art Ruhemodus? Hauptmann *et al.* konnten in diesem Zusammenhang bereits zeigen, dass eine Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der chronischen Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion im Mausmodell zu einem Wiederanstieg der Bakterien führte, so dass dies auf eine Funktionalität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch während der chronischen Phase der Infektion hindeutet [Hauptmann *et al.*; Manuskript in Vorbereitung].

Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* sowohl während der akuten als auch während der chronischen Phase in der Lunge sowie in der Milz an den meisten Zeitpunkten eine signifikant erhöhte Expression von KLRG1 auf. In chronischen humanen viralen Infektionen wie HIV (Humanes Immundefizienzvirus), Zytomegalovirus oder Epstein-Barr Virus konnte bereits gezeigt werden, dass die virusspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen überwiegend KLRG1 exprimieren [268]. In einer bereits überstandenen Influenza-Virusinfektion exprimieren die CD8<sup>+</sup> T-Zellen jedoch kein KLRG1. Thimme *et al.* postulierten in diesem Zusammenhang, dass der Status der Differenzierung und die Funktion von virusspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen direkt durch eine persistierende Antigenstimulation beeinflusst wird [268]. Auch bei der Infektion mit *O. tsutsugamushi* liegen die Bakterien in der chronischen Phase persistierend vor, so dass auch für *O. tsutsugamushi* als intrazelluläres Bakterium ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der persistierenden Antigenstimulation und der Expression von KLRG1 vorliegen kann. Schaut man sich die Daten genauer an, kann sogar weiter postuliert werden, dass während einer chronischen Infektion mit *O. tsutsugamushi* mit der persistierenden Antigenstimulation die CD8<sup>+</sup> T-Zellen doppelt positiv für KLRG1 und CD11a sind.

KLRG1 gilt weiterhin als Marker für eine replikative Seneszenz von murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen [103]. Während der *O. tsutsugamushi* Infektion zeigten die CD8<sup>+</sup> pulmonalen T-Zellen sowohl während der akuten als auch während der chronischen Phase eine signifikant erhöhte Expression von bis zu 80 %. Auch während einer LCMV Infektion (WE Stamm) kommt es zu einer starken Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die nach einer gewissen Anzahl an Teilungen einen Status der terminalen Differenzierung aufzeigen. Dieser zeichnet sich durch eine Expression von KLRG1 von mehr als 50 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus [269]. Es konnte anhand der LCMV Infektion gezeigt werden, dass die KLRG1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwar nicht mehr proliferieren können, ihre Fähigkeit Zytokine zu produzieren aber beibehalten [269]. Die Proliferation der T-Zellen wird dabei über ein ITIM-Motiv, das KLRG1 an seinem zytoplasmatischen Ende besitzt, gehemmt [103]. Die KLRG1<sup>+</sup> sowie KLRG1<sup>-</sup> T-Zellen unterscheiden sich bei einer LCMV Infektion jedoch nicht in ihrer Effektorfunktion [269]. Diese Daten sprechen dafür, dass sich auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der chronischen Phase der Infektion in der Lunge zwar nicht mehr teilen können, ihre Effektorfunktion aber bewahren, indem sie weiterhin Zytokine sekretieren können. Die Expression von KLRG1 während der *O. tsutsugamushi* Infektion spricht also dafür, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zellen funktional bleiben.

Auch CD11a wird während der *O. tsutsugamushi* Infektion in der Lunge über den gesamten untersuchten Zeitraum (akut und chronisch) vermehrt auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert. CD11a ist ein wichtiges Adhäsionsmolekül und ein Teil der immunologischen

Synapse [270], das nach der Aktivierung von T-Zellen vermehrt exprimiert wird [271]. Da es über den gesamten Zeitraum der *O. tsutsugamushi* Infektion vermehrt auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Lunge zu finden ist, deutet dies auf eine anhaltende T-Zell-Aktivierung in der Lunge auch über die akute Phase der Infektion hinaus, hin.

Dies konnte auch nach Infektionen mit *L. monocytogenes* und *M. tuberculosis* gezeigt werden [271, 272]. Ein Fehlen von CD11a während einer *M. tuberculosis* Infektion führt zu einem verminderten Schutz. Dieser wird durch ein verzögertes T-Zell-*Priming* und durch Defekte in der T-Zell-Migrationsfähigkeit, wodurch weniger antigenspezifische T-Zellen in der Lunge nach der Infektion gefunden werden können, ausgelöst [272]. Auch diese Daten sprechen dafür, dass die in der chronischen Phase der Infektion vorhandenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen während einer *O. tsutsugamushi* Infektion noch funktional sind und für den Schutz des Wirtes benötigt werden. Während einer *L. monocytogenes* Infektion wird sogar gesagt, dass CD11a essentiell für eine optimale T-Zell-Expansion in Antwort auf das intrazelluläre Bakterium ist [271]. CD11a kann in Abwesenheit von anderen antigenspezifischen Markern (z.B. bei ausgezuchteten Mäusen mit einem polymorphen MHC-Molekül) als Marker für antigenspezifische T-Zellen genutzt werden [94]. Einmal antigenspezifisch aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen bleiben demnach CD11a<sup>+</sup>, selbst wenn die Bakterienlast in der chronischen Phase der Infektion schon wieder abnimmt.

Im Gegensatz zu KLRG1 und CD11a konnte während der *O. tsutsugamushi* Infektion GrzB in der Lunge lediglich während der akuten Phase signifikant erhöht auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert nachgewiesen werden. Ab d21 nimmt GrzB zwar wieder ab, liegt aber tendenziell im Vergleich zu den naiven Mäusen weiter erhöht vor. In der Milz zeigt GrzB an d12 sein Maximum, nimmt bis d50 wieder ab, wobei es über den gesamten Zeitraum im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe signifikant erhöht bleibt. De Fost *et al.* konnten eine erhöhte Menge an löslichem GrzB bereits im Menschen während einer akuten Infektion mit *O. tsutsugamushi* nachweisen [106]. Allerdings erfolgte der Nachweis im Blutplasma mittels ELISA und ist somit nicht direkt vergleichbar. Während einer akuten Verlaufsform des LCMV (Armstrong Stamm) konnte die Rolle von GrzB bereits untersucht werden [273]. Das Fehlen von GrzB führte hier zu einer verzögerten Bekämpfung des Virus, konnte aber teilweise von anderen zytotoxischen Effektormolekülen, wie z.B. GrzA, kompensiert werden. Ob eine Bekämpfung von *O. tsutsugamushi* auch ohne GrzB möglich wäre, müsste mit der entsprechenden Knockout Maus untersucht werden. Allerdings könnte die erhöhte Expression von GrzB während der akuten Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion in der Lunge auch vorliegen, da hier die höchste Bakterienlast nachzuweisen ist und GrzB an der Bekämpfung der infizierten Zielzellen durch eine Einleitung der Apoptose beteiligt ist [93]. In der chronischen Phase der Infektion scheint GrzB in der Lunge und der Milz dann ggf. aufgrund der sinkenden Bakterienlast ebenfalls zu sinken, bleibt aber im Vergleich zu den naiven Kontrollgruppen in der Lunge tendenziell und in der Milz signifikant erhöht.

Die Summe der Daten zu den Aktivierungsmarkern KLRG1, CD11a und GrzB zeigen, dass gerade während der chronischen Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion, in der die Bakterienlast sinkt, die T-Zellen ihren aktivierten Phänotyp behalten.

Es stellt sich jedoch die Frage, warum gerade die CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Lunge aktivierter

sind, als die der Milz. Basierend auf den Kinetikdaten sowie durch vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe, konnte die Lunge als Hauptorgan der *O. tsutsugamushi* Infektion ausgemacht werden. In der Lunge als primär nicht-lymphatisches Organ wandern CD8<sup>+</sup> T-Zellen erst getriggert durch die Infektion ein, so dass in der Lunge aufgrund der erregerspezifischen T-Zellen eine gezielte Antwort auf *O. tsutsugamushi* beobachtet werden kann. Es ist denkbar, dass in der Lunge mehr aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen als in der Milz benötigt werden, um die Bakterien zu bekämpfen, da in ihr die Bakterienlast besonders stark ist. In der Milz als sekundäres lymphatisches Organ sind viele T-Zellen anderer Spezifitäten zu finden.

Bei chronischen Infektionen sind die T-Zellen oft in ihrer Funktionalität eingeschränkt, so dass es zu einer Schwächung der T-Zell-Immunantwort z.B. gegen Viren kommt. Dies ist auch ein häufiger Grund, weshalb der Wirt den Erreger nicht eliminieren kann, und weshalb es zu einer Ausbildung einer Persistenz, wie z.B. bei einer LCMV Infektion, kommt. In diesem Zusammenhang wird häufig von „erschöpften“ T-Zellen gesprochen [186]. „Erschöpfte“ T-Zellen zeichnen sich durch die Expression der koinhibitorischen Rezeptoren, wie z.B. PD-1, CTLA-4, TIM-3 und LAG-3 [274] und eine verringerte Zytokinexpression von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ , aus [145]. Während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* nahmen in der chronischen Phase die untersuchten koinhibitorischen Rezeptoren CTLA-4, TIM-3 und LAG-3 wieder ab. Lediglich für PD-1 konnte eine tendenziell erhöhte Expression von PD-1 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an d21 mit ca. 30 bzw. 10 % gezeigt werden. Quantitativ scheint PD-1 dabei auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine größere Rolle während einer *O. tsutsugamushi* Infektion zu spielen. Am Beispiel der LCMV Infektion untersuchten Barber *et al.* die Rolle von PD-1 auf den „Erschöpfungszustand“ der CD8<sup>+</sup> T-Zellen hin [186]. Sie beschreiben dabei zwei Typen von PD-1. Zum einen das PD-1, das während der akuten Phase der LCMV Infektion (Armstrong Stamm) hochreguliert wird und nach einer überstandenen Infektion auch schnell wieder eine abnehmende Expression zeigt. Auf der anderen Seite zeigen sie eine erhöhte PD-1 Expression während der chronischen Verlaufsform von LCMV (Klon13), bei der die PD-1 Expression durchgehend erhöht bleibt. Eine Blockade des PD-1/PD-L1 Signalweges konnte die Effektorfunktion der T-Zellen wieder herstellen und zu einer gesteigerten Virusabwehr beitragen. Eine Blockade von PD-1 während der chronischen Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion führte zu einer erhöhten Bakterienlast und keiner Wiederherstellung der Effektorantwort der T-Zellen. Durch die Blockade von PD-1 wurde zwar eine vermehrte Produktion von IFN $\gamma$  induziert, allerdings deuten erste Daten dieser Arbeit darauf hin, dass es sich bei den IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen um Zellen handelt, die auch IL-10 produzieren und somit nicht zu einer Effektorantwort beitragen. PD-1 kann demnach hier nicht für die Persistenz von *O. tsutsugamushi* verantwortlich gemacht werden. Bei *O. tsutsugamushi* kann demnach von keinem „Erschöpfungszustand“ der T-Zellen während der chronischen Phase ausgegangen werden. Das PD-1, das während der chronischen Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion nachgewiesen werden konnte, könnte eine andere Funktion haben, als das PD-1, das während der chronischen LCMV Form von Barber *et al.* gezeigt werden konnte [186]. Allerdings wäre es auch möglich, dass während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* ge-

nerell ein sehr viel geringeres Antigenlevel im Vergleich zu der LCMV Infektion vorliegt, so dass die Funktion von PD-1 in beiden Infektionsmodellen auch gleich sein könnte, jedoch bei *O. tsutsugamushi* keine so durchschlagende Rolle spielt. Es ist jedoch denkbar, dass PD-1 auch innerhalb der *O. tsutsugamushi* Infektion verschiedene Funktionen während der akuten und der chronischen Phase aufweist. Dafür spricht einerseits, dass eine Blockade von PD-1 während der akuten Phase der Infektion keinen Effekt auf die Bakterienlast hatte, während andererseits die Bakterienlast nach einer Blockade während der chronischen Phase zu einer gesteigerten Bakterienlast in der Lunge führte. Zu der Funktion von PD-1 während der akuten Phase kann noch keine detaillierte Aussage getroffen werden, da die Blockade von PD-1 während der akuten Phase keinerlei Einfluss zeigte. Allerdings gibt es Studien, die PD-1 nicht nur als Marker für erschöpfte T-Zellen beschreiben, sondern zudem als Kennzeichen für die Aktivierung von T-Zellen [274]. Wie auch in der vorliegenden Arbeit dargestellt, beschreiben Legat *et al.* CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die zwar PD-1 exprimieren, aber weiterhin IFN $\gamma$  produzieren und somit ihre Effektorfunktion beibehalten. So ist auch während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* während der akuten Phase PD-1 als Marker für aktivierte T-Zellen denkbar. Da durch die Blockade von PD-1 während der chronischen Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion ein gesteigerter Anteil an IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden konnte, die zudem IFN $\gamma$  produzieren, könnte das PD-1 während der chronischen Phase der Infektion die IL-10-Antwort bremsen. Das IL-10 könnte demnach während der chronischen Phase der Infektion über PD-1 gesteuert werden. Diesbezüglich liegen jedoch noch keine Publikationen vor.

## 5.2 CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 - Kompensation der fehlenden Tregs während der *Orientia tsutsugamushi* Infektion

Bei den Tregs handelt es sich um die wichtigste Zellpopulation, die an der negativen Regulation von T-Zell-Immunantworten beteiligt ist, um die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen zu unterdrücken [111]. In anderen Infektionsmodellen, wie zum Beispiel *M. tuberculosis* konnte bereits gezeigt werden, dass Tregs während der Infektion im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollgruppen zunehmen [122]. Während einer Influenza Virus Infektion im Mausmodell konnte von Bedoya *et al.* sogar eine vermehrte Treg-Proliferation in der Lunge gezeigt werden [275]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch während einer murinen Infektion mit *O. tsutsugamushi* eine Abnahme der Tregs während der akuten Phase der Infektion, sowohl in der Milz als auch in der Lunge, nachgewiesen werden. Auch in humanen Patienten, die an dem Tsutsugamushi-Fieber erkrankt waren, konnte von Cho *et al.* im Patientenserum eine Abnahme an Tregs im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Allerdings lagen dort die Tregs sowohl während der akuten Phase als auch während der Rekonvaleszenzzeit reduziert vor [121], während die Tregs bei den Experimenten dieser Arbeit in den Mausorganen lediglich während der akuten Phase reduziert waren. Cho *et al.* diskutieren die Abnahme der Tregs als eine Folge einer Migration und Akkumulation von supprimierenden Zellen in entzündete Ge-

webe, wie es auch schon bei anderen chronischen Infektionen beobachtet werden konnte [121, 276]. Allerdings konnten in der vorliegenden Arbeit in der Lunge, einem Organ, das während der *O. tsutsugamushi* Infektion eine Entzündung aufweist, keine Tregs nachgewiesen werden. Auch in der Lunge konnte eine Abnahme der Tregs gezeigt werden, so dass die Annahme von Cho *et al.* widerlegt werden konnte. Cho *et al.* vermuten zudem einen Zusammenhang zwischen dem systemischen Abfall der Tregs und einem gleichzeitigen Anstieg an CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einer gesteigerten zytotoxischen Aktivität [106, 121]. Auch im murinen Modell konnte im Rahmen dieser Arbeit ein signifikanter Anstieg der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einer gesteigerten Aktivität gezeigt werden. Dieser konnte für die absoluten CD8<sup>+</sup> T-Zellen bereits an d12 p.i. nachgewiesen werden und blieb bis in die chronische Phase bestehen. Für die akute Phase (d12 p.i.) konnte hier die Vermutung von Cho *et al.* bestätigt werden, dass die Abnahme der Tregs in einem Zusammenhang mit gesteigerten CD8<sup>+</sup> T-Zellen steht. Während der chronischen Phase konnte in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme der Tregs gezeigt werden, die CD8<sup>+</sup> T-Zellen gehen jedoch nicht zurück, sondern bleiben weiterhin erhöht und behalten ihren aktivierten Status bei. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Migration und Akkumulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im murinen Modell als Auslöser für die reduzierte Treg Anzahl eher unwahrscheinlich ist. Die Daten der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort unabhängig von den Tregs steigt.

Eine andere Möglichkeit, die zu einer Abnahme der Tregs im Rahmen der *O. tsutsugamushi* Infektion führen kann, könnte eine Limitierung der Differenzierung naiver T-Zellen zu Tregs sein. Es gibt dazu bereits Studien, die eine Beteiligung inflammatorischer Mediatoren, wie z.B. IFN $\gamma$ , an der Umwandlung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Foxp3<sup>+</sup> Tregs beschreiben, in dem ein Anstieg an Tregs in IFN $\gamma$  defizienten Mäusen gezeigt werden konnte [277]. Das IFN $\gamma$  inhibiert demnach die Bildung von Foxp3<sup>+</sup> Tregs [277]. Da in dieser Arbeit während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* an d12 p.i. eine erhöhte INF $\gamma$ -Produktion gezeigt werden konnte und diese genau in dem Zeitraum lag, in dem die Tregs reduziert vorlagen, ist eine solche durch INF $\gamma$  inhibierte Bildung der Tregs auch während der *O. tsutsugamushi* Infektion als Grund für die reduzierte Treg Anzahl denkbar. Allerdings sprechen Studien von IFN $\gamma$ -assoziierten Infektionen, wie z.B. *M. tuberculosis*, bei denen eine gesteigerte IFN $\gamma$ -Produktion sowie eine erhöhte Anzahl an Tregs gezeigt werden konnte, gegen diese Theorie [122, 278].

Neben der gehemmten Differenzierung der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Tregs soll laut Oldenhove *et al.* auch eine verringerte Proliferation sowie eine vermehrte Apoptose der Tregs an der Abnahme der Tregs beteiligt sein [279]. Sie zeigten in diesem Zusammenhang, dass die reduzierte Anzahl an Tregs bei einer *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) Infektion durch eine geringere Proliferation ausgelöst wurde. Es kann auch angenommen werden, dass Tregs vermehrt in Apoptose geschickt werden, da sie bei einer *O. tsutsugamushi* Infektion möglicherweise die Pathogenabwehr verschlechtern oder die Persistenz verstärken würden. Allerdings sprechen in diesem Fall Ergebnisse von Vorversuchen dagegen, bei denen eine Depletion der Tregs an d0 und d4 p.i. während einer *O. tsutsugamushi* Infektion die Bakterienlast in untersuchten Organen weiter steigerte (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich demnach vermuten, dass das Vorhandensein der Tregs zu einer verbesserten Bak-

terienabwehr beitragen kann. Basierend auf dieser Annahme wäre es denkbar, dass die Präsentation von *O. tsutsugamushi*-Antigenen zum Beispiel über MHC-II für die Abnahme der Tregs sorgt, um so die Überlebenschancen des Bakteriums im Wirt zu verbessern. Es ist zum Beispiel vorstellbar, dass *O. tsutsugamushi* bestimmte Peptide produziert, deren Präsentation zu einer Depletion der Tregs führt. Eine ähnliche Idee verfolgten Graz und Campbell, die eine Expression spezieller Peptide durch Pathogene nicht ausschließen, so dass diese die Fähigkeit besitzen, Tregs erfolgreich zu triggern [280].

Die Abnahme der Tregs in Milz und Lunge während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* könnte allerdings auch durch eine Migration der Tregs in andere Gewebe ausgelöst werden, so dass diese zwar in den untersuchten Organen weniger werden, im gesamten Organismus jedoch nicht abnehmen. Tregs können sowohl die *Priming*- als auch die Effektorphase der Immunantwort inhibieren. Demnach muss die Inhibierung der Immunantwort einerseits in den lymphatischen Geweben und andererseits in den peripheren Geweben, in denen die Immunreaktion abläuft, stattfinden. Aus diesem Grund vermuten Huehn und Hamann für Tregs eine Fähigkeit zur Migration, die zugleich ihre supprimierenden Kapazitäten *in vivo* beeinflusst [281]. Denkbar wäre zum Beispiel eine Wanderung der Tregs aus der Lunge in ihre drainierenden Lymphknoten (mediastinale Lymphknoten), was zum einen den reduzierten Anteil der Tregs in der Lunge nach einer *O. tsutsugamushi* Infektion erklären würde. Zum anderen wären die Tregs trotzdem in der Nähe der Lunge, die den Hauptort der Infektion darstellt. Eine vermehrte Proliferation der Tregs in den drainierenden Lymphknoten der Lunge konnte von Bedoya *et al.* während einer Infektion mit Influenza gezeigt werden, so dass ein Vorkommen der Tregs in den mediastinalen Lymphknoten generell möglich ist [275]. Um diese Theorie während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* zu bestätigen, würde sich eine Untersuchung der regionalen Lymphknoten der Lunge anbieten.

Auffallend ist auch, dass sich die Bakterienlast von *O. tsutsugamushi* in der Lunge und der Milz invers zu der absoluten Treg Anzahl in den untersuchten Organen verhält. In der akuten Phase der Infektion, in der die meisten Bakterien vorhanden waren, liegt eine besonders geringe Treg Anzahl vor. In der chronischen Phase hingegen, in der die Bakterienlast wieder sinkt, kommt es zu einer Zunahme der Tregs, die zwar im Vergleich zu den naiven Mäusen nicht signifikant, jedoch tendenziell erhöht ausfällt. Oldenhove *et al.* machten eine ähnliche Beobachtung während einer Infektion mit *T. gondii*. Sie zeigten, dass der Treg Abfall während einer *T. gondii* Infektion mit der Pathogenese des Parasiten korreliert. Je geringer die Dosis des Parasiten war, desto geringer fiel die Pathologie aus und desto mehr Tregs waren vorhanden [279].

Um den genauen Mechanismus benennen zu können, der bei einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* zu einer Abnahme der Tregs in der Lunge und der Milz während der akuten Phase der Infektion führt, müssen weitere Untersuchungen erfolgen. Völlig unabhängig von dem Mechanismus, der für die Abnahme der Tregs verantwortlich ist, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Abnahme der Tregs während der *O. tsutsugamushi* Infektion die wichtigste Zellpopulation, die an der negativen Regulation von T-Zell-Immunantworten beteiligt ist, fehlt [111]. Da eine Immunantwort immer von einem Gleichgewicht zwischen kostimulierenden und koinhibitorischen Mechanismen

geprägt ist [111], geben die Daten Grund zu der Annahme, dass das Fehlen der Tregs während einer *O. tsutsugamushi* Infektion durch andere regulatorische Mechanismen kompensiert werden muss. Die gezeigte erhöhte Expression der untersuchten koinhibitorischen Rezeptoren CTLA-4, PD-1, TIM-3 und LAG-3 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterstützt diese Theorie, dass andere Regulationsmechanismen an der Immunantwort während einer *O. tsutsugamushi* Infektion beteiligt sind.

### 5.3 CTLA-4 - Sicherung der Homöostase von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten während der *Orientia tsutsugamushi* Infektion

CTLA-4 spielt während einer Immunantwort eine herunterregulierende Rolle, indem es eine anhaltende Immunantwort der aktivierten T-Zellen beendet [178]. Mäuse, denen das CTLA-4 fehlt, zeigen einen lymphoproliferativen Phänotyp. Dieser zeichnet sich durch einen T-Zell-Ansturm mit einer gleichzeitigen Hochregulation von Aktivierungsmarkern in Milz und Lymphknoten aus [181]. Auch in Lunge, Leber, Herz und Pankreas zeigten Waterhouse *et al.* eine solche T-Zell-Invasion. Das Fehlen von CTLA-4 führt zu einem frühen Tod der Mäuse im Alter von 3-4 Wochen [181], der durch Gewebsschädigungen mit einer schweren Myokarditis und Pankreatitis ausgelöst wird [282]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* durch die Blockade von CTLA-4 während der akuten Phase der Infektion ein Anstieg an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge gezeigt werden. Gleichzeitig kam es zu einem reduzierten Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge. Die Daten deuten darauf hin, dass die Lymphozytenhomöostase durch das Fehlen von CTLA-4 während der akuten Phase der Infektion gestört wird. Ein Fehlen des CTLA-4 während der chronischen Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion verändert die Verteilung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> pulmonalen T-Zellen jedoch nicht, so dass CTLA-4 einen größeren Einfluss während der akuten Phase der Infektion, in der das *Priming* der T-Zellen stattfindet, zu haben scheint. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die inhibitorischen Effekte von CTLA-4 bereits detektiert werden können, wenn noch keine Expression von CTLA-4 an der Oberfläche der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie möglich ist [150, 283, 284]. Krummel und Allison gehen demnach davon aus, dass CTLA-4 eine größere regulierende Rolle während der frühen Stadien der T-Zell-Aktivierung besitzt [283]. Allerdings gilt es hierbei zu bedenken, dass Krummel und Allison CTLA-4 lediglich auf der Zelloberfläche färbten. Jedoch kommt nur ein geringer Anteil von CTLA-4 auf der Zelloberfläche vor. Die Mehrheit befindet sich in intrazellulären Kompartimenten und rezirkuliert zwischen dem Inneren der Zelle und der Zelloberfläche [158–160].

Die Blockade von CTLA-4 während der akuten Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion führte zu einem Anstieg der CD4<sup>+</sup>, nicht aber der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. *In vitro* Studien konnten bereits nachweisen, dass  $\alpha$ -CTLA-4 die T-Zell-Proliferation steigern kann [283]. Auch *in vivo* Studien zeigten eine gesteigerte Expansion von T-Zellen, die reaktiv zu einem spezifischen Peptidantigen oder dem Superantigen *Staphylococcus enterotoxin B* waren



[285, 286]. Auch aus diesen Studien geht hervor, dass CTLA-4 eine wichtige Rolle bei der Herunterregulation der T-Zell-Antwort hat.

Es gibt bereits verschiedene Theorien, wie CTLA-4 seine regulierende Funktion, also die Regulation der T-Zell-Expansion, ausübt [178]. Eine Möglichkeit ist dabei, dass CTLA-4 apoptotische Mechanismen auslöst, um so die T-Zell-Antworten zu beenden [287]. Bei einer anderen Möglichkeit inhibiert CTLA-4 die IL-2 Akkumulation und die T-Zell-Proliferation [178]. Die Anwesenheit von CTLA-4 stoppt hierbei die T-Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus, so dass davon ausgegangen wird, dass die Inhibition der T-Zell-Proliferation und IL-2-Sekretion durch CTLA-4 auch ohne die Anwesenheit von apoptotischen Mechanismen stattfinden kann [178]. Umgekehrt dazu müsste ein Fehlen von CTLA-4 zu einem Anstieg der T-Zell-Proliferation und ein Anstieg der IL-2-Sekretion gezeigt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit führte die Blockade von CTLA-4 während der akuten Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion jedoch in der Lunge lediglich zu einem Anstieg der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Ein gleichzeitiger Anstieg der IL-2-Produktion der T-Zellen in der Lunge konnte hingegen nicht gezeigt werden. Allerdings erfolgte die Untersuchung von IL-2 durch durchflusszytometrische Analysen der Lungenzellen. Der Nachweis von IL-2 durch Krummel und Allison erfolgte hingegen mittels ELISA [178], so dass die IL-2 Daten nicht direkt vergleichbar sind und somit diese Theorie für eine *O. tsutsugamushi* Infektion nicht direkt ausgeschlossen werden kann. Es bleibt also denkbar, dass die Blockade von CTLA-4 dazu führt, dass die T-Zellen aus der G0/G1 Phase des Zellzyklus in die S Phase übergehen können, jedoch müssten zunächst weitere Untersuchungen während einer *O. tsutsugamushi* Infektion folgen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Veränderung des CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Gleichgewichtes in der Lunge lediglich durch eine Blockade von CTLA-4 während der akuten Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion nachgewiesen werden. Eine Blockade von PD-1 oder aber eine Blockade von PD-1 in Kombination mit TIM-3 und LAG-3 hatte keinen vergleichbaren Effekt, so dass der Einfluss auf die Lymphozytenhomöostase spezifisch für CTLA-4 zu sein scheint. Schon McCoy *et al.* beschrieben CTLA-4 als ein wichtiges Molekül, das in die Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase involviert ist [282]. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass CTLA-4 der am stärksten vertretene untersuchte koinhibitorische Rezeptor auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist und auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen quantitativ eine geringere Rolle spielte, ist ein Effekt auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Blockade von CTLA-4 sehr naheliegend. Offenbar wirkt CTLA-4 im *O. tsutsugamushi*-Modell stark bremsend auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die bei einer Blockade von CTLA-4 bevorzugt in die Lunge einwandern. Ob die Expansion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen an einer verstärkten Proliferation, an einer veränderten Chemotaxis oder an einem anderen Grund liegt, muss experimentell noch geklärt werden.

## 5.4 IL-10<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> koproduzierende Zellen als Auslöser der erhöhten Bakterienlast

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das die Immunantwort auf Pathogene begrenzt und somit inflammatorischen und autoimmunen Schäden vorbeugen soll [237]. Ein Fehlen von IL-10 führt jedoch nicht zwangsläufig zu einer verstärkten Immunpathologie, sondern kann bei einigen Pathogenen wie z.B. LCMV zu ihrer besseren Bekämpfung beitragen [251, 252]. Im Gegenzug dazu ist das Vorhandensein von IL-10 dafür bekannt, die Anfälligkeit für zahlreiche intrazelluläre Mikroorganismen zu steigern und somit an der Bildung einer Persistenz von Bakterien wie z.B. *Bartonella quintana* oder *M. tuberculosis* beteiligt zu sein [137, 255, 256].

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* eine gesteigerte Bakterienlast in der Lunge mit einer erhöhten Produktion von IL-10 in einen Zusammenhang gebracht werden. Schon Koh *et al.* zeigten auf mRNA Ebene, dass IL-10 bei einer *O. tsutsugamushi* Infektion den protektiven Effekt von IFN $\gamma$  hemmt und somit die Anfälligkeit für eine Infektion erhöht [260]. Matthias Hauptmann zeigte 2013, dass während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* sowohl IFN $\gamma$  als auch IL-10 von T-Zellen produziert werden [77]. Ghigo *et al.* gehen bei einer *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) Infektion davon aus, dass IL-10 die Replikation des intrazellulären Bakteriums in den menschlichen Monozyten durch eine Verminderung von TNF $\alpha$  erhöht [288]. Während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* konnte jedoch keine verminderte TNF $\alpha$ -Produktion bei einer gleichzeitigen Steigerung der IL-10-Produktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), so dass ein ähnlicher Zusammenhang bei *O. tsutsugamushi* unwahrscheinlich ist. Andere Studien zeigen, dass IL-10 überexprimierende Mäuse zu einer persistierenden *C. burnetii* Infektion führen [256]. Die IL-10 Überexpression soll dabei in einem Zusammenhang mit einer anhalten Präsenz von *C. burnetii* in Geweben und hohen Leveln an spezifischen Antikörpern stehen und Auslöser einer steigenden Infektion in der Lunge sein [256].

Interessanterweise deuten die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass es sich bei den IL-10 produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in *O. tsutsugamushi* infizierten Mäusen nach einer späten Blockade von PD-1 gleichzeitig um Produzenten von IFN $\gamma$  handelt. Koh *et al.* konnten in der Peritonealflüssigkeit gleichzeitig IL-10 und IFN $\gamma$  mRNA nachweisen und schließen daraus, dass IL-10 die IFN $\gamma$  mRNA nicht herunterreguliert [260]. Sie gehen davon aus, dass die gleichzeitige Produktion von IL-10 und IFN $\gamma$  gegen eine Entwicklung der klassischen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zelltypen spricht [260], obwohl in dieser Studie keine Untersuchung der T-Zellen erfolgte. Auch während der kutanen Leishmaniose konnte im Mausmodell ein IL-10<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> koproduzierender Zelltyp für den chronischen Verlauf der Infektion verantwortlich gemacht werden [257]. Bei dem Zelltyp könnte es sich um T<sub>R</sub>1 Zellen, einer Subpopulation der iTregs, handeln. T<sub>R</sub>1 Zellen sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die sowohl IL-10 als auch IFN $\gamma$  produzieren [289]. Ihren supprimierenden Effekt erlangen sie über IL-10 und Koinhibitoren, wie etwa CTLA-4, LAG-3 und PD-1, die sie auf ihrer Oberfläche exprimieren [289]. Auch während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* könnten T<sub>R</sub>1 Zellen für die erhöhte Bakterienlast verantwortlich sein. Jedoch müsste

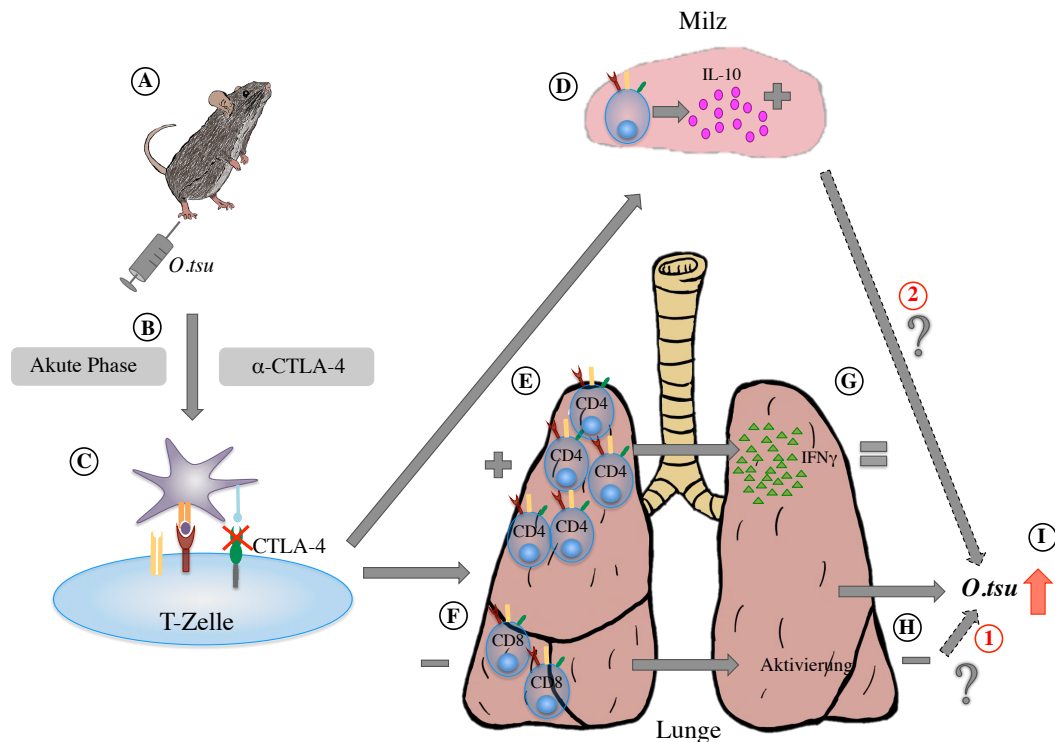
zur genauen Verifizierung getestet werden, ob die IL-10<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> koproduzierenden Zellen gleichzeitig die Koinhibitoren CTLA-4, PD-1 und LAG-3 exprimieren, wie es für T<sub>R</sub>1 Zellen gezeigt werden konnte [289]. Zum jetzigen Zeitpunkt kann nur gesagt werden, dass es Zellen gibt, die diese Koinhibitoren vermehrt exprimieren, nicht aber, ob es sich bei diesen Zellen gleichzeitig um den IL-10<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> koproduzierenden Zelltyp handelt. Auch Koh *et al.* postulierten aufgrund des Nachweises des Zytokinprofils, bei dem ein hohes Level an IL-10 und IFN $\gamma$  ohne einen Anstieg an IL-2 oder IL-4 zu finden war, die Theorie einer Beteiligung der T<sub>R</sub>1 Zellen während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* [260].

Ähnlich zu der Theorie von Gazzinelli *et al.*, die beschreibt, dass die Induktion von IL-10 eine wichtige Strategie sein könnte, mit der der Parasit *T. gondii* der IFN $\gamma$  abhängigen, Zell-vermittelten Immunantwort entgeht [254], könnte auch bei einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* die Produktion von IL-10 als Teil einer Überlebensstrategie des Bakteriums denkbar sein. Kramme *et al.* konnten die IL-10 und IFN $\gamma$  Zytokinantwort erstmals in Verbindung mit der Bakterienlast im Blut von Patienten mit dem Tsutsugamushi-Fieber bringen [259]. Sie bestätigten die kombinierte gesteigerte Produktion von IFN $\gamma$  und IL-10 im Menschen während der akuten Phase der Infektion, die zuvor schon im Mausmodell von Koh *et al.* sowie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte [260]. Kramme *et al.* zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen IL-10 und der Bakterienlast im Blut der mit *O. tsutsugamushi* infizierten Patienten und gehen davon aus, dass durch die inhibierende Wirkung des IL-10 auf die Immunantwort dem Bakterium das Überleben in einer intrazellulären Umgebung erleichtert wird, wie es auch für eine Infektion mit *Legionella pneumophila* bereits gezeigt werden konnte [290]. Für *O. tsutsugamushi* konnte von Kim *et al.* im Mausmodell bereits gezeigt werden, dass durch das Bakterium IL-10 induziert wird, das dann wiederum die TNF $\alpha$ -Produktion der Makrophagen inhibiert [258]. Sie postulierten in diesem Zusammenhang das Vorhandensein eines IL-10-induzierenden Faktors, der auf aktivierten Makrophagen während einer *O. tsutsugamushi* Infektion aktiv ist und den negativen Feedback Mechanismus, der IL-10 zugeschrieben wird, fördert. Dies ermöglicht es den Bakterien in der Umgebung von Makrophagen zu überleben [258].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Produktion von IL-10 während einer *O. tsutsugamushi* Infektion durch eine frühe Blockade von CTLA-4 bzw. einer späten Blockade von PD-1 erhöht wird, was für die gesteigerte Bakterienlast in der Lunge verantwortlich sein kann. Die negativen Regulatoren CTLA-4 und PD-1 scheinen demnach für die effiziente Bekämpfung des Bakteriums notwendig zu sein. Ihre Blockade hingegen scheint in diesem Fall für *O. tsutsugamushi* nützlich zu sein. Wie genau die Zusammenhänge zwischen einer Blockade von CTLA-4 während der akuten Phase der Infektion bzw. von PD-1 während der chronischen Phase der Infektion und einer erhöhten IL-10-Produktion von IFN $\gamma$  koproduzierenden T<sub>R</sub>1 Zellen besteht, müsste in weiterführenden Studien untersucht werden.

## 5.5 Modell zur CTLA-4 Blockade während einer *Orientia tsutsugamushi* Infektion

Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zur Untersuchung des koinhibitorischen Rezeptors CTLA-4 konnte ein Modell erstellt werden, das den Einfluss von CTLA-4 während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* graphisch erläutert (siehe Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.1: Modell zur CTLA-4 Blockade während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi*.**

Auf eine Infektion (A) einer C57BL/6 Maus mit *O. tsutsugamushi* (*O. tsu*) folgte eine Blockade von CTLA-4 (C) durch eine dreimalige Injektion von  $\alpha$ -CTLA-4 während der akuten Phase der Infektion (B). Durch die Blockade kommt es zu einem Anstieg der IL-10-Produktion durch T-Zellen in der Milz (D). In der Lunge führt die Blockade von CTLA-4 zu einer Zunahme an  $CD4^+$  (E) sowie einer Abnahme der  $CD8^+$  (F) T-Zellen. Die  $CD4^+$  T-Zellen produzieren im Vergleich zur nicht blockierten Maus unverändert  $IFN\gamma$  (G). Die  $CD8^+$  T-Zellen weisen eine verminderte Aktivierung auf (H). Eine Blockade von CTLA-4 während der akuten Phase der Infektion führt zu einer erhöhten Bakterienlast in der Lunge (I). 1. Möglichkeit (1) für die erhöhte Bakterienlast in der Lunge könnte die verminderte Anzahl an  $CD8^+$  T-Zellen mit ihrer verminderten Aktivität sein. Denkbar ist auch, dass die erhöhte IL-10-Produktion durch T-Zellen in der Milz verantwortlich für die gesteigerte Bakterienlast in der Lunge ist (2).

Bei *O. tsutsugamushi* infizierten C57BL/6 Mäusen (*O. tsu*; A), führt eine dreimalige Behandlung mit  $\alpha$ -CTLA-4 während der akuten Phase der Infektion (B) zu einer Blockade des koinhibitorischen CTLA-4 Moleküls auf aktivierten T-Zellen (C). Es kommt zu einem Anstieg der IL-10-Produktion durch T-Zellen in der Milz, die ebenfalls eine erhöhte Bakterienlast nach einer CTLA-4 Blockade aufweist (Daten nicht gezeigt; D). Gleichzeitig wird eine massive Zunahme an  $CD4^+$  (E) T-Zellen und eine Abnahme an  $CD8^+$  T-Zellen (F) in der Lunge durch die CTLA-4 Blockade ausgelöst. Die  $CD4^+$  pulmonalen T-Lymphozyten produzieren im Vergleich zu der nicht blockierten Kontrollgruppe unverändert  $IFN\gamma$  (G), während die  $CD8^+$  T-Zellen einen verminderten Aktivierungsstatus zeigen (H). In der Summe führt die CTLA-4 Blockade während der akuten Phase einer *O. tsutsugamushi*

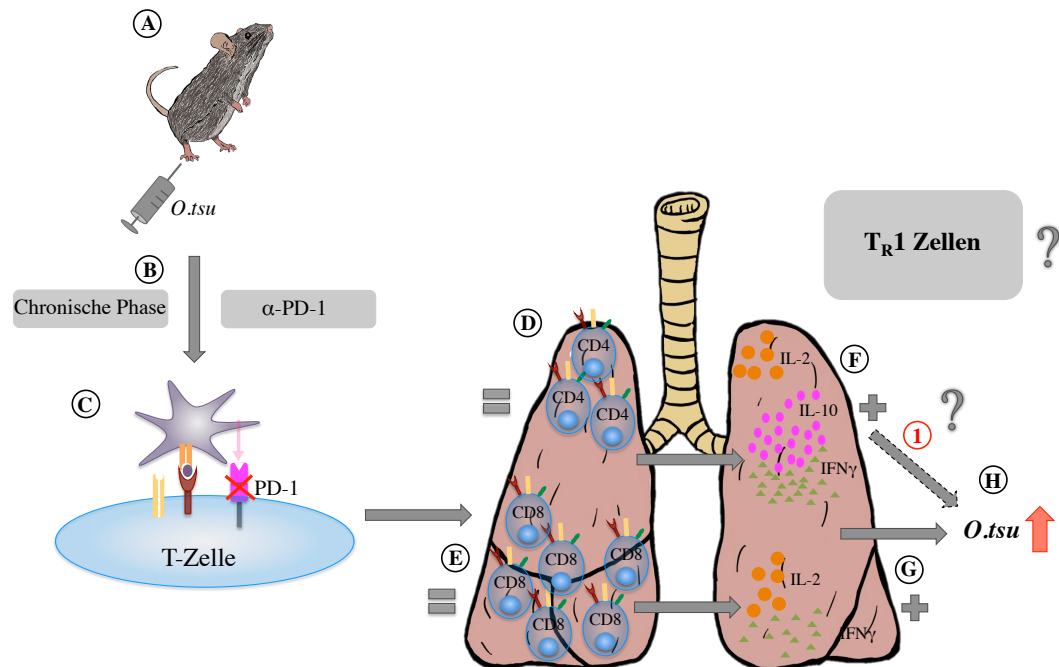
Infektion zu einer erhöhten Bakterienlast in der Lunge (I).

Basierend auf diesen Erkenntnissen sind zwei Mechanismen denkbar, die für die erhöhte Bakterienlast in der Lunge verantwortlich gemacht werden können. Als erstes (1) kann die verminderte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Anzahl in der Lunge mit ihrem verminderten Aktivierungsstatus direkt zu einer ineffizienteren Bakterienabwehr und der damit verbundenen erhöhten Bakterienlast in der Lunge führen. Es gibt bereits Studien, die im Mausmodell den Zusammenhang zwischen fehlenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen und einem gesteigerten Bakterienwachstum während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* nachweisen konnten [Hauptmann *et al.*; Manuskript in Vorbereitung]. Als zweiter Mechanismus (2) kann die gesteigerte IL-10-Produktion durch T-Zellen in der Milz verantwortlich für die erhöhte Bakterienlast gemacht werden. Sowohl im Menschen als auch in der Maus konnte für *O. tsutsugamushi* Infektionen gezeigt werden, dass IL-10 in Verbindung mit einem gesteigerten Bakterienwachstum steht [258, 259]. Als IL-10-Produzenten kommen aufgrund der Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 in der vorliegenden Arbeit generell nur T-Zellen in Frage. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Tregs während der akuten Phase der *O. tsutsugamushi* Infektion stark reduziert vorliegen, können diese als Produzenten des IL-10 in diesem Modell ausgeschlossen werden. Während einer akuten Infektion mit dem Influenza Virus konnten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen in der Lunge als Produzenten von IL-10 nachgewiesen werden. Eine Blockade des von den Effektor-T-Zellen abstammenden IL-10 führte jedoch zu einer verstärkten Lungeninflammation mit tödlichem Verlauf [291]. Im Gegensatz dazu scheint jedoch bei der *O. tsutsugamushi* Infektion das Vorhandensein von IL-10 mit einem schlechteren Krankheitsverlauf und einer erhöhten Bakterienlast in Verbindung gebracht werden zu können, so dass auch die Effektor-T-Zellen in diesem Modell als IL-10-Produzenten unwahrscheinlich sind. Es verbleiben die CD4<sup>+</sup> T<sub>R</sub>1 Zellen, die sowohl IL-10 produzieren können und zudem zum Beispiel bei der kutanen Leishmaniose das Überleben des Pathogens begünstigten [257]. Die CTLA-4 Blockade könnte in diesem Fall einerseits die Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in T<sub>R</sub>1 Zellen begünstigen, die dann für eine reduzierte Bakterienabwehr sorgen und somit eine mögliche Erklärung für die erhöhte Bakterienlast sein könnten. Andererseits ist denkbar, dass die CTLA-4 exprimierenden T<sub>R</sub>1 Zellen bereits vorhanden sind und durch die  $\alpha$ -CTLA-4 Behandlung ihre IL-10-Produktion dereprimiert wird.

Zudem vermuteten auch schon Koh *et al.* eine Beteiligung von T<sub>R</sub>1 Zellen während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* [260]. Die Tatsache, dass eine Blockade von CTLA-4 zu einer vermehrten Bakterienlast führt, lässt vermuten, dass das CTLA-4 während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* für die Bekämpfung der Bakterien eine entscheidende Rolle spielt.

## 5.6 Modell zur PD-1 Blockade während einer *Orientia tsutsugamushi* Infektion

Auch für die Blockade von PD-1 während der chronischen Phase einer *O. tsutsugamushi* Infektion konnte ein Modell erstellt werden (siehe Abbildung 5.2).



**Abbildung 5.2: Modell zur PD-1 Blockade während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi*.**

(A) C57BL/6 Mäuse werden mit *O. tsutsugamushi* (*O.tsu*) infiziert und während der chronischen Phase der Infektion dreimalig mit  $\alpha$ -PD-1 behandelt (B), was zu einer Blockade von PD-1 führt (C). Durch die Blockade von PD-1 bleibt der Anteil an  $CD4^+$  (D) und  $CD8^+$  (E) T-Zellen in der Lunge unverändert. Die  $CD4^+$  T-Zellen produzieren eine erhöhte Menge an IL-2 sowie von einem Zelltyp gleichzeitig IL-10 und  $IFN\gamma$  (F), während die  $CD8^+$  T-Zellen mehr IL-2 und  $IFN\gamma$  produzieren (G). Trotz der erhöhten  $IFN\gamma$ -Produktion kommt es zu einem Anstieg der Bakterienlast in der Lunge (H). Es ist denkbar, dass es sich bei den  $IL-10^+ IFN\gamma^+$  koproduzierenden  $CD4^+$  T-Zellen um  $T_{R1}$  Zellen (1) handelt, die zu der erhöhten Bakterienlast führen.

Eine dreimalige Behandlung von *O. tsutsugamushi* (*O.tsu*; A) infizierten C57BL/6 Mäusen mit  $\alpha$ -PD-1 während der chronischen Phase der Infektion (B) führt zu einer Blockade von PD-1 auf T-Zellen (C). Im Gegensatz zur CTLA-4 Blockade führt eine PD-1 Blockade während der chronischen Phase zu keiner Veränderung des  $CD4^+$  (D) und  $CD8^+$  (E) T-Zell-Gleichgewichtes in der Lunge, was noch einmal die Theorie verstärkt, dass CTLA-4, nicht aber PD-1, an der Homöostase der  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Anteile beteiligt ist. Die pulmonalen  $CD4^+$  T-Zellen produzieren nach der späten PD-1 Blockade vermehrt IL-2. Des Weiteren gibt es  $CD4^+$  T-Zellen die IL-10 und von der selben Zelle  $IFN\gamma$  koproduzieren (F). Die  $CD8^+$  T-Zellen der Lunge zeigen ebenfalls eine verstärkte IL-2 sowie eine erhöhte  $IFN\gamma$ -Produktion (G), was für eine vermehrte Proliferation und Aktivität spricht. Trotzdem sind die  $CD8^+$  T-Zellen nicht in der Lage, die Bakterienlast zu reduzieren. Im Gegenteil dazu führt eine Blockade von PD-1 während der chronischen Phase der Infektion zu einer erhöhten Bakterienlast in der Lunge (H). Die vermehrte Produktion von IL-10 könnte demnach einen stärkeren Einfluss auf die Bakterienlast haben als  $IFN\gamma$  und könnte für die erhöhte Bakterienlast in der Lunge verantwortlich sein. Da die Daten dieser Arbeit

---

auf eine mögliche Koproduktion von IL-10 und IFN $\gamma$  durch die CD4<sup>+</sup> T-Zellen hinweisen, die jedoch kaum IL-2 produzieren (Daten nicht gezeigt), ist denkbar, dass es sich um T<sub>R</sub>1 Zellen handelt (1), die die erhöhte Bakterienlast in der Lunge induzieren.

Wie schon für die CTLA-4 Blockade während der akuten Phase der Infektion gezeigt, scheint eine späte Blockade von PD-1 die Produktion von IL-10 zu begünstigen. Die Datenlage zu der späten Blockade von PD-1 deutet zudem daraufhin, dass die Blockade von PD-1 während der chronischen Phase der Infektion die Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>R</sub>1 Zellen fördert und so die Überlebenschancen von *O. tsutsugamushi* in der Lunge zu steigern scheint. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit deuten erste Hinweise darauf hin, dass die Beteiligung von IL-10 ein interessantes Konzept während der Infektion mit *O. tsutsugamushi* darstellt, das jedoch weiter untersucht werden müsste, um die Zusammenhänge verstehen und bestätigen zu können.

Im Umkehrschluss deuten die Daten darauf hin, dass der koinhibitorische Rezeptor PD-1 während einer Infektion mit *O. tsutsugamushi* für die effiziente Bekämpfung des Bakteriums benötigt wird.

---

## Literaturverzeichnis

- [1] WK Joklik. Structure, components, and classification of viruses. *Zinsser Microbiology. 20th ed. Norwalk, Conn: Appleton and Lange*, 775:777–779, 1992.
- [2] Andrew J Taylor, Daniel H Paris, and Paul N Newton. A systematic review of mortality from untreated scrub typhus (*orientia tsutsugamushi*). *PLoS Negl Trop Dis*, 9(8):e0003971, 2015.
- [3] R Rosenberg. Drug-resistant scrub typhus: Paradigm and paradox. *Trends of Parasitology*, 13(4):131–132, 1997.
- [4] Akiyoshi Kawamura. *Tsutsugamushi disease*. University of Tokyo Press, 1995.
- [5] Naosuke Hayashi. Etiology of tsutsugamushi disease. *The Journal of Parasitology*, 7(2):53–68, 1920.
- [6] M Nagayo, T Tamiya, T Mitamura, K Sato, et al. The virus of the tsutsugamushi disease. *Compte rendu des seances de la Societe de biologie*, 104:637–41, 1930.
- [7] N Ogata. Aetiologie der tsutsugamushi-krankheit: *Rickettsia tsutsugamushi*. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Abt*, 1:249–253, 1931.
- [8] Akira Tamura, Norio Ohashi, Hiroshi Urakami, and Sadao Miyamura. Classification of *rickettsia tsutsugamushi* in a *orientia* gen. nov., as *orientia tsutsugamushi*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, pages 589–591, 1995.
- [9] K Amano, Akira Tamura, Norio Ohashi, Hiroshi Urakami, Shunji Kaya, and K Fukushima. Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in *rickettsia tsutsugamushi*. *Infection and immunity*, 55(9):2290–2292, 1987.
- [10] Mohammad Hamdi Gharaibeh. *Involvement of Toll-like Receptor 2 in Recognition of Orientia tsutsugamushi by the Innate Immune System*. PhD thesis, Freie Universität Berlin, Germany, 2013.
- [11] Teruyuki Enatsu, Hiroshi Urakami, and Akira Tamura. Phylogenetic analysis of *orientia tsutsugamushi* strains based on the sequence homologies of 56-kda type-specific antigen genes. *FEMS microbiology letters*, 180(2):163–169, 1999.
- [12] Keisuke Nakayama, Ken Kurokawa, Masahiro Fukuhara, Hiroshi Urakami, Seigo Yamamoto, Kazuko Yamazaki, Yoshitoshi Ogura, Tadasuke Ooka, and Tetsuya Hayashi. Genome comparison and phylogenetic analysis of *orientia tsutsugamushi* strains. *DNA research*, page dsq018, 2010.
- [13] Piengchan Sonthayanon, Sharon J Peacock, Wirongrong Chierakul, Vanaporn Wuthiekanun, Stuart D Blacksell, MT Holden, Stephen D Bentley, Edward J Feil, and NP Day. High rates of homologous recombination in the mite endosymbiont and opportunistic human pathogen *orientia tsutsugamushi*. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(7):e752–e752, 2010.



- 
- [14] A Tamura, H Urakami, and N Ohashi. A comparative view of rickettsia tsutsugamushi and the other groups of rickettsiae. *European journal of epidemiology*, 7(3):259–269, 1991.
- [15] EP Ewing, Akio Takeuchi, Akira Shirai, and Joseph V Osterman. Experimental infection of mouse peritoneal mesothelium with scrub typhus rickettsiae: an ultrastructural study. *Infection and immunity*, 19(3):1068–1075, 1978.
- [16] AJ Saah. *Orientia tsutsugamushi* (scrub typhus). *Principles and practice of infectious disease. 5th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone*, pages 2056–2057, 2000.
- [17] Hiroshi Urakami, Takashi Tsuruhara, and Akira Tamura. Intranuclear rickettsia tsutsugamushi in cultured mouse fibroblasts (l cells). *Microbiology and immunology*, 26(5):445–447, 1982.
- [18] Yan Ge and Yasuko Rikihisa. Subversion of host cell signaling by orientia tsutsugamushi. *Microbes and Infection*, 13(7):638–648, 2011.
- [19] Jung-Hee Lee, Nam-Hyuk Cho, Se-Yoon Kim, Sun-Young Bang, Hyuk Chu, Myung-Sik Choi, and Ik-Sang Kim. Fibronectin facilitates the invasion of orientia tsutsugamushi into host cells through interaction with a 56-kda type-specific antigen. *Journal of Infectious Diseases*, 198(2):250–257, 2008.
- [20] Na-Young Ha, Nam-Hyuk Cho, Yeon-Sook Kim, Myung-Sik Choi, and Ik-Sang Kim. An autotransporter protein from orientia tsutsugamushi mediates adherence to non-phagocytic host cells. *Infection and immunity*, 79(4):1718–1727, 2011.
- [21] Bon-A Cho, Nam-Hyuk Cho, Seung-Yong Seong, Myung-Sik Choi, and Ik-Sang Kim. Intracellular invasion by orientia tsutsugamushi is mediated by integrin signaling and actin cytoskeleton rearrangements. *Infection and immunity*, 78(5):1915–1923, 2010.
- [22] Hyuk Chu, Jung-Hee Lee, Seung-Hoon Han, Se-Yoon Kim, Nam-Hyuk Cho, Ik-Sang Kim, and Myung-Sik Choi. Exploitation of the endocytic pathway by orientia tsutsugamushi in nonprofessional phagocytes. *Infection and immunity*, 74(7):4246–4253, 2006.
- [23] Hang-Rae Kim, Myung-Sik Choi, and Ik-Sang Kim. Role of syndecan-4 in the cellular invasion of orientia tsutsugamushi. *Microbial pathogenesis*, 36(4):219–225, 2004.
- [24] Pamela Schnupf and Daniel A Portnoy. Listeriolysin o: a phagosome-specific lysin. *Microbes and Infection*, 9(10):1176–1187, 2007.
- [25] Radek Stachowiak and Jacek Bielecki. Contribution of hemolysin and phospholipase activity to cytolytic properties and viability of listeria monocytogenes. *Acta Microbiologica Polonica*, 50(3):243–250, 2001.
- [26] Sang-Wook Kim, Kyung-Soo Ihn, Seung-Hoon Han, Seung-Yong Seong, Ik-Sang Kim, and Myung-Sik Choi. Microtubule-and dynein-mediated movement of orientia tsutsugamushi to the microtubule organizing center. *Infection and immunity*, 69(1):494–500, 2001.

- [27] Cecilia G Moron, Vsevolod L Popov, Hui-Min Feng, Douglas Wear, and David H Walker. Identification of the target cells of orientia tsutsugamushi in human cases of scrub typhus. *Modern Pathology*, 14(8):752–759, 2001.
- [28] Thomas R Shelite, Tais B Saito, Nicole L Mendell, Bin Gong, Guang Xu, Lynn Soong, Gustavo Valbuena, Donald H Bouyer, and David H Walker. A hematogenously disseminated orientia tsutsugamushi-infected murine model of scrub typhus. *Plos Negl Trop Dis*, 8(8), 2014.
- [29] WD Kundin, Chien Liu, Patricia Harmon, and Patricia Rodina. Pathogenesis of scrub typhus infection (rickettsia tsutsugamushi) as studied by immunofluorescence. *The Journal of Immunology*, 93(5):772–781, 1964.
- [30] Christian A Keller, Matthias Hauptmann, Julia Kolbaum, Mohammad Gharaibeh, Melanie Neumann, Markus Glatzel, and Bernhard Fleischer. Dissemination of orientia tsutsugamushi and inflammatory responses in a murine model of scrub typhus. *Plos Negl Trop Dis*, (8), 2014.
- [31] Yeon Joo Jeong, Suk Kim, Yeh Dae Wook, Jun Woo Lee, Kun-Il Kim, and Sun Hee Lee. Scrub typhus: Clinical, pathologic, and imaging findings 1. *Radiographics*, 27(1):161–172, 2007.
- [32] Panita Tanskul, Daniel Strickman, Chirapa Eamsila, and Daryl J Kelly. Rickettsia tsutsugamushi in chiggers (acari: Trombiculidae) associated with rodents in central thailand. *Journal of medical entomology*, 31(2):225–230, 1994.
- [33] SC Oaks, RL Ridgway, A Shirai, JC Twartz, et al. Scrub typhus. 1983.
- [34] Gustavo Valbuena, David H Walker, et al. Infection of the endothelium by members of the order rickettsiales. *Thromb Haemost*, 102(6):1071–1079, 2009.
- [35] George Watt and Philippe Parola. Scrub typhus and tropical rickettsioses. *Current opinion in infectious diseases*, 16(5):429–436, 2003.
- [36] Seung-Ji Kang, Kyung-Hwa Park, Sook-In Jung, Hee Chang Jang, Soo Young Ji, Jae Sook Ahn, Hyeoung Joon Kim, Jong-Hee Shin, and Dong Min Kim. Scrub typhus induced by peripheral blood stem cell transplantation in the immunocompromised patient: diagnostic usefulness of nested polymerase chain reaction. *Transfusion*, 50(2):467–470, 2010.
- [37] BG Casleton, K Salata, GA Dasch, D Strickman, and DJ Kelly. Recovery and viability of orientia tsutsugamushi from packed red cells and the danger of acquiring scrub typhus from blood transfusion. *Transfusion*, 38(7):680–689, 1998.
- [38] Seung-Yong Seong, Myung-Sik Choi, and Ik-Sang Kim. Orientia tsutsugamushi infection: overview and immune responses. *Microbes and Infection*, 3(1):11–21, 2001.
- [39] M Elvira Balcells, Ricardo Rabagliati, Patricia García, Helena Poggi, David Oddó, Marcela Concha, Katia Abarca, Ju Jiang, Daryl J Kelly, Allen L Richards, et al. Technical Report 9.
- [40] Leonard Izzard, Andrew Fuller, Stuart D Blacksell, Daniel H Paris, Allen L Richards, Nuntipa Aukkanit, Chelsea Nguyen, Ju Jiang, Stan Fenwick, Nicholas PJ Day, et al.

- Isolation of a novel orientia species (*O. chuto* sp. nov.) from a patient infected in Dubai. *Journal of clinical microbiology*, 48(12):4404–4409, 2010.
- [41] Rhonda P Ghorbani, Ashkan J Ghorbani, Manoj K Jain, David H Walker, et al. A case of scrub typhus probably acquired in Africa. *Clinical infectious diseases*, 25(6):1473–1474, 1997.
- [42] George Watt and Daniel Strickman. Life-threatening scrub typhus in a traveler returning from Thailand. *Clinical infectious diseases*, 18(4):624–626, 1994.
- [43] Isao Ebisawa. Current epidemiology and treatment of tsutsugamushi disease in Japan. *Journal of travel medicine*, 2(4):218–220, 1995.
- [44] Daniel H Paris, Rattanaphone Phetsouvanh, Ampai Tanganuchitcharnchai, Margaret Jones, Kemajittra Jenjaroen, Manivanh Vongsouvath, DP Ferguson, Stuart D Blacksell, Paul N Newton, NP Day, et al. *Orientia tsutsugamushi* in human scrub typhus eschars shows tropism for dendritic cells and monocytes rather than endothelium. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(1):e1466–e1466, 2012.
- [45] David H Walker et al. *Biology of rickettsial diseases. Vol. I and Vol. II*. CRC Press, Inc., 1988.
- [46] Senaka Rajapakse, Chaturaka Rodrigo, and Sumadhya Deepika Fernando. Drug treatment of scrub typhus. *Tropical doctor*, 41(1):1–4, 2011.
- [47] Joseph E Smadel, Herbert L Ley, Fred H Diercks, and Jap Cameron. Persistence of *Rickettsia tsutsugamushi* in tissues of patients recovered from scrub typhus. *American Journal of Epidemiology*, 56(3):294–302, 1952.
- [48] Moon-Hyun Chung, Jin-Soo Lee, Ji-hyeon Baek, Mijeong Kim, and Jae-Seung Kang. Persistence of *Orientia tsutsugamushi* in humans. *Journal of Korean medical science*, 27(3):231–235, 2012.
- [49] Akira Shirai, Teik Chye Chan, Elsie Gan, and David L Huxsoll. Persistence and reactivation of *Rickettsia tsutsugamushi* infections in laboratory mice. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 32(3):179–184, 1979.
- [50] Matthias Niedrig and Robert-Koch-Institut. *Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten*. Robert-Koch-Inst., 2006.
- [51] Na-Young Ha, Prashant Sharma, Gwanghun Kim, Yuri Kim, Chan-Ki Min, Myung-Sik Choi, Ik-Sang Kim, and Nam-Hyuk Cho. Immunization with an autotransporter protein of *Orientia tsutsugamushi* provides protective immunity against scrub typhus. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(3):e0003585–e0003585, 2015.
- [52] Woradee Lurchachaiwong, Taweesak Monkanna, Surachai Leepitakrat, Alongkot Ponlawat, Jetsumon Sattabongkot, Anthony L Schuster, Patrick W McCardle, and Allen L Richards. Variable clinical responses of a scrub typhus outbred mouse model to feeding by *Orientia tsutsugamushi* infected mites. *Experimental and applied acarology*, 58(1):23–34, 2012.
- [53] Russell E Coleman, Taweesak Monkanna, Kenneth J Linthicum, Daniel A Strickman, Stephen P Frances, Panita Tanskul, Thomas M Kollars, Inkam Inlao, Pochaman Watcharapichat, Nittaya Khilaimanee, et al. Occurrence of *Orientia tsutsuga-*

- mushi in small mammals from thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 69(5):519–524, 2003.
- [54] John P Fox. The long persistence of rickettsia orientalis in the blood and tissues of infected animals. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 59(2):109–114, 1948.
- [55] Michael G Groves and Joseph V Osterman. Host defenses in experimental scrub typhus: genetics of natural resistance to infection. *Infection and immunity*, 19(2):583–588, 1978.
- [56] Michael G Groves and Daryl J Kelly. Characterization of factors determining rickettsia tsutsugamushi pathogenicity for mice. *Infection and immunity*, 57(5):1476–1482, 1989.
- [57] NG Kekcheeva and IN Kokorin. Different allotypic susceptibility of mice to rickettsia tsutsugamushi. *Acta virologica*, 20(2):142–146, 1976.
- [58] Charles A Janeway and Paul Travers. *Immunologie*. Spektrum Akad. Verlag, 2009.
- [59] John D MacMicking, Gregory A Taylor, and John D McKinney. Immune control of tuberculosis by ifn- $\gamma$ -inducible lrg-47. *Science*, 302(5645):654–659, 2003.
- [60] Frank R DeLeo, Lee-Ann H Allen, Michael Apicella, and William M Nauseef. NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 163(12):6732–6740, 1999.
- [61] Simon A Jones, Valerie B O’Donnell, Jonathan D Wood, Jonathan P Broughton, Eleanor J Hughes, and Ot Jones. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 271(4):H1626–H1634, 1996.
- [62] Hui-Min Feng and David H Walker. Mechanisms of intracellular killing of rickettsia conorii in infected human endothelial cells, hepatocytes, and macrophages. *Infection and immunity*, 68(12):6729–6736, 2000.
- [63] KP Beckerman, HW Rogers, JA Corbett, RD Schreiber, ML McDaniel, and ER Unanue. Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. its role in resistance to listeria monocytogenes. *The Journal of Immunology*, 150(3):888–895, 1993.
- [64] Rakesh P Patel, Joanne McAndrew, Hassan Sellak, C Roger White, Hanjoong Jo, Bruce A Freeman, and Victor M Darley-Usmar. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1411(2):385–400, 1999.
- [65] Lothar Rink, Andrea Kruse, Hajo Haase, and Martin Lay. *Immunologie für Einsteiger*. Springer, 2012.
- [66] Charles D Surh and Jonathan Sprent. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*, 372(6501):100–103, 1994.
- [67] Timothy K Starr, Stephen C Jameson, and Kristin A Hogquist. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology*, 21(1):139–176, 2003.

- [68] Mark H Kaplan. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunological reviews*, 252(1):104–115, 2013.
- [69] SQ Crome, AY Wang, and MK Levings. Translational mini-review series on th17 cells: Function and regulation of human t helper 17 cells in health and disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 159(2):109–119, 2010.
- [70] Ariana Peck and Elizabeth D Mellins. Plasticity of t-cell phenotype and function: the t helper type 17 example. *Immunology*, 129(2):147–153, 2010.
- [71] Timothy R Mosmann, Holly Cherwinski, Martha W Bond, Martin A Giedlin, and Robert L Coffman. Two types of murine helper t cell clone. i. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136(7):2348–2357, 1986.
- [72] Mario Milco D’Elios, Marisa Benagiano, Chiara Della Bella, and Amedeo Amedei. T-cell response to bacterial agents. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5(09):640–645, 2011.
- [73] Bärbel Raupach and Stefan HE Kaufmann. Immune responses to intracellular bacteria. *Current opinion in immunology*, 13(4):417–428, 2001.
- [74] Toshi Nagata and Yukio Koide. Induction of specific cd8+ t cells against intracellular bacteria by cd8+ t-cell-oriented immunization approaches. *BioMed Research International*, 2010, 2010.
- [75] Thomas R Jerrells and Joseph V Osterman. Host defenses in experimental scrub typhus: delayed-type hypersensitivity responses of inbred mice. *Infection and immunity*, 35(1):117–123, 1982.
- [76] David H Walker and J Stephen Dumler. The role of cd8 t lymphocytes in rickettsial infections. In *Seminars in immunopathology*, pages 1–11. Springer, 2015.
- [77] Matthias Hauptmann. *Orientia tsutsugamushi Infektion in der Maus: Organotropismus und lymphozytenabhängige Immunantwort*. PhD thesis, Universität Hamburg.
- [78] David A Ferrick, Mark D Schrenzel, Thera Mulvania, Beryl Hsieh, Walter G Ferlin, and Heather Lepper. Differential production of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 in response to th1-and th2-stimulating pathogens by  $\gamma\delta$  t cells in vivo. *Nature*, 373:255–257, 1995.
- [79] Thorsten R Mempel, Sarah E Henrickson, and Ulrich H Von Andrian. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, 427(6970):154–159, 2004.
- [80] Jason G Cyster. Chemokines and the homing of dendritic cells to the t cell areas of lymphoid organs. *The Journal of experimental medicine*, 189(3):447–450, 1999.
- [81] Ryu Yoshida, Morio Nagira, Motoji Kitaura, Noriko Imagawa, Toshio Imai, and Osamu Yoshie. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the cc chemokine receptor ccr7. *Journal of Biological Chemistry*, 273(12):7118–7122, 1998.
- [82] James J Campbell, Edward P Bowman, Kristine Murphy, Kenneth R Youngman, Michael A Siani, Darren A Thompson, Lijun Wu, Albert Zlotnik, and Eugene C

- Butcher. 6-c-kine (slc), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the mip-3 $\beta$  receptor ccr7. *The Journal of cell biology*, 141(4):1053–1059, 1998.
- [83] Ira Mellman and Ralph M Steinman. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106(3):255–258, 2001.
- [84] Alan Aderem and Richard J Ulevitch. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406(6797):782–787, 2000.
- [85] Shizuo Akira, Kiyoshi Takeda, and Tsuneyasu Kaisho. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*, 2(8):675–680, 2001.
- [86] Marianne JB van Stipdonk, Edward E Lemmens, and Stephen P Schoenberger. Naive ctls require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nature immunology*, 2(5):423–429, 2001.
- [87] Christine Heufler, Franz Koch, Ursula Stanzl, Gerda Topar, Maria Wysocka, Giorgio Trinchieri, Alexander Enk, Ralph M Steinman, Nikolaus Romani, and Gerold Schuler. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates t helper 1 development as well as interferon- $\gamma$  production by t helper 1 cells. *European journal of immunology*, 26(3):659–668, 1996.
- [88] Thomas F Gajewski and Frank W Fitch. Anti-proliferative effect of ifn-gamma in immune regulation. i. ifn-gamma inhibits the proliferation of th2 but not th1 murine helper t lymphocyte clones. *The Journal of Immunology*, 140(12):4245–4252, 1988.
- [89] Michael J Grusby. Impaired il-12 responses and enhanced development of th2 cells in stat4-deficient mice. *Nature*, 382:11, 1996.
- [90] Abul K Abbas, Andrew HH Lichtman, and Shiv Pillai. *Cellular and molecular immunology: with Student Consult Online Access*. Elsevier Health Sciences, 2012.
- [91] Arash Grakoui, Shannon K Bromley, Cenk Sumen, Mark M Davis, Andrey S Shaw, Paul M Allen, and Michael L Dustin. The immunological synapse: a molecular machine controlling t cell activation. *Science*, 285(5425):221–227, 1999.
- [92] Matthew E Pipkin and Judy Lieberman. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current opinion in immunology*, 19(3):301–308, 2007.
- [93] Manabu Kurokawa and Sally Kornbluth. Caspases and kinases in a death grip. *Cell*, 138(5):838–854, 2009.
- [94] Deepa Rai, Nhat-Long L Pham, John T Harty, and Vladimir P Badovinac. Tracking the total cd8 t cell response to infection reveals substantial discordance in magnitude and kinetics between inbred and outbred hosts. *The Journal of Immunology*, 183(12):7672–7681, 2009.
- [95] Ilkka Jaakkola, Marika Merinen, Sirpa Jalkanen, and Arno Hänninen. Ly6c induces clustering of lfa-1 (cd11a/cd18) and is involved in subtype-specific adhesion of cd8 t cells. *The Journal of Immunology*, 170(3):1283–1290, 2003.
- [96] Y Van Kooyk, P Van de Wiel-van Kemenade, P Weder, TW Kuijpers, and CG Fig-

- dor. Enhancement of lfa-1-mediated cell adhesion by triggering through cd2 or cd3 on t lymphocytes. 1989.
- [97] Yoji Shimizu, Gijs A van Seventer, E Ennis, W Newman, KJ Horgan, and S Shaw. Crosslinking of the t cell-specific accessory molecules cd7 and cd28 modulates t cell adhesion. *The Journal of experimental medicine*, 175(2):577–582, 1992.
- [98] Nikolai A Raffler, Jesús Rivera-Nieves, and Klaus Ley. L-selectin in inflammation, infection and immunity. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2(3):213–220, 2005.
- [99] Martin W Nicholson, A Neil Barclay, Mark S Singer, Steven D Rosen, and P Anton van der Merwe. Affinity and kinetic analysis of l-selectin (cd62l) binding to glycosylation-dependent cell-adhesion molecule-1. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2):763–770, 1998.
- [100] Pasquale Mansueto, Giustina Vitale, Antonio Cascio, Aurelio Seidita, Ilenia Pepe, Antonio Carroccio, Salvatore Di Rosa, Giovam Battista Rini, Enrico Cillari, and David H Walker. New insight into immunity and immunopathology of rickettsial diseases. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 2011.
- [101] Nikhil S Joshi, Weiguo Cui, Anmol Chandele, Heung Kyu Lee, David R Urso, James Hagman, Laurent Gapin, and Susan M Kaech. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector cd8+ t cell fates via the graded expression of t-bet transcription factor. *Immunity*, 27(2):281–295, 2007.
- [102] David Voehringer, Marie Koschella, and Hanspeter Pircher. Lack of proliferative capacity of human effector and memory t cells expressing killer cell lectinlike receptor g1 (klrg1). *Blood*, 100(10):3698–3702, 2002.
- [103] Sian M Henson and Arne N Akbar. Klr1 more than a marker for t cell senescence. *Age*, 31(4):285–291, 2009.
- [104] Marlowe S Tessmer, Céline Fugere, Frederik Stevenaert, Olga V Naidenko, H Jonathan Chong, Georges Leclercq, and Laurent Brossay. Klr1 binds cadherins and preferentially associates with ship-1. *International immunology*, 19(4):391–400, 2007.
- [105] Stipan Jonjic. Functional plasticity and robustness are essential characteristics of biological systems: Lessons learned from klrg1-deficient mice. *European journal of immunology*, 40(5):1241–1243, 2010.
- [106] Maaïke de Fost, Wirongrong Chierakul, Kriangsak Pimda, Arjen M Dondorp, Nicholas J White, and TOM van der Poll. Activation of cytotoxic lymphocytes in patients with scrub typhus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 72(4):465–467, 2005.
- [107] Thomas R Jerrells and Peigin Geng. The role of tumor necrosis factor in host defense against scrub typhus rickettsiae. ii. differential induction of tumor necrosis factor-alpha production by rickettsia tsutsugamushi and rickettsia conorii. *Microbiology and immunology*, 38(9):713–719, 1994.
- [108] Ca Nancy and Jv Osterman. Host defenses in experimental scrub typhus: role of normal and activated macrophages. *Infection and immunity*, 26(2):744–750, 1979.

- [109] Carol A Nacy and Monte S Meltzer. Macrophages in resistance to rickettsial infection: macrophage activation in vitro for killing of rickettsia tsutsugamushi. *The Journal of Immunology*, 123(6):2544–2549, 1979.
- [110] Wirongrong Chierakul, Maaike de Fost, Yupin Suputtamongkol, Roongreung Limpaboon, Arjen Dondorp, Nicholas J White, and Tom van der Poll. Differential expression of interferon- $\gamma$  and interferon- $\gamma$ -inducing cytokines in thai patients with scrub typhus or leptospirosis. *Clinical Immunology*, 113(2):140–144, 2004.
- [111] Kingston HG Mills. Regulatory t cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature Reviews Immunology*, 4(11):841–855, 2004.
- [112] Stefan Beissert, Agatha Schwarz, and Thomas Schwarz. Regulatory t cells. *Journal of investigative dermatology*, 126(1):15–24, 2006.
- [113] Shimon Sakaguchi, Noriko Sakaguchi, Masanao Asano, Misako Itoh, and Masaaki Toda. Immunologic self-tolerance maintained by activated t cells expressing il-2 receptor alpha-chains (cd25). breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*, 155(3):1151–1164, 1995.
- [114] Cristina Cozzo, Joseph Larkin, and Andrew J Caton. Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of cd4+ cd25+ regulatory t cells. *The Journal of Immunology*, 171(11):5678–5682, 2003.
- [115] Jeffrey A Bluestone and Abul K Abbas. Natural versus adaptive regulatory t cells. *Nature Reviews Immunology*, 3(3):253–257, 2003.
- [116] Shimon Sakaguchi. Naturally arising cd4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 22:531–562, 2004.
- [117] Tobias Bopp, Christian Becker, Matthias Klein, Stefan Klein-Hefßling, Alois Palmethofer, Edgar Serfling, Valeska Heib, Marc Becker, Jan Kubach, Steffen Schmitt, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory t cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine*, 204(6):1303–1310, 2007.
- [118] Yasmine Belkaid. Regulatory t cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews Immunology*, 7(11):875–888, 2007.
- [119] Jason D Fontenot, Marc A Gavin, and Alexander Y Rudensky. Foxp3 programs the development and function of cd4+ cd25+ regulatory t cells. *Nature immunology*, 4(4):330–336, 2003.
- [120] Simon Read, Vivianne Malmström, and Fiona Powrie. Cytotoxic t lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of cd25+ cd4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine*, 192(2):295–302, 2000.
- [121] Bon-A Cho, Youngho Ko, Yeon-Sook Kim, Sanguk Kim, Myung-Sik Choi, Ik-Sang Kim, Hang-Rae Kim, and Nam-Hyuk Cho. Phenotypic characterization of peri-



- pheral t cells and their dynamics in scrub typhus patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(8):e1789, 2012.
- [122] Valerie Guyot-Revol, John A Innes, Sarah Hackforth, Tim Hinks, and Ajit Lalvani. Regulatory t cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 173(7):803–810, 2006.
- [123] Ana M Sanchez, Jianguo Zhu, Xiaopei Huang, and Yiping Yang. The development and function of memory regulatory t cells after acute viral infections. *The Journal of immunology*, 189(6):2805–2814, 2012.
- [124] Birte Blankenhaus, Ulrike Klemm, Marie-Luise Eschbach, Tim Sparwasser, Jochen Huehn, Anja A Köhl, Christoph Loddenkemper, Thomas Jacobs, and Minka Breloer. Strongyloides ratti infection induces expansion of foxp3+ regulatory t cells that interfere with immune response and parasite clearance in balb/c mice. *The journal of immunology*, 186(7):4295–4305, 2011.
- [125] Erica G Schmitt and Calvin B Williams. Generation and function of induced regulatory t cells. *Frontiers in immunology*, 4, 2013.
- [126] Ela Martin, Brendan O’Sullivan, Pauline Low, and Ranjeny Thomas. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory t cells secreting interleukin-10. *Immunity*, 18(1):155–167, 2003.
- [127] Madhav V Dhodapkar, Ralph M Steinman, Joseph Krasovsky, Christian Munz, and Nina Bhardwaj. Antigen-specific inhibition of effector t cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 193(2):233–238, 2001.
- [128] Helmut Jonuleit, Edgar Schmitt, Gerold Schuler, Jürgen Knop, and Alexander H Enk. Induction of interleukin 10–producing, nonproliferating cd4+ t cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 192(9):1213–1222, 2000.
- [129] Manfred B Lutz, Rakesh M Suri, Masanori Niimi, Alexandra LJ Ogilvie, Nicole A Kukutsch, Susanne Rossner, Gerold Schuler, and Jonathan M Austyn. Immature dendritic cells generated with low doses of gm-csf in the absence of il-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *European journal of immunology*, 30(7):1813–1822, 2000.
- [130] Peter McGuirk, Chantelle McCann, and Kingston HG Mills. Pathogen-specific t regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells a novel strategy for evasion of protective t helper type 1 responses by bordetella pertussis. *The Journal of experimental medicine*, 195(2):221–231, 2002.
- [131] Ed C Lavelle, Edel McNeela, Michelle E Armstrong, Olive Leavy, Sarah C Higgins, and Kingston HG Mills. Cholera toxin promotes the induction of regulatory t cells specific for bystander antigens by modulating dendritic cell activation. *The Journal of Immunology*, 171(5):2384–2392, 2003.

- [132] Pádraig J Ross, Ed C Lavelle, Kingston HG Mills, and Aoife P Boyd. Adenylate cyclase toxin from bordetella pertussis synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of th2 and regulatory t cells. *Infection and immunity*, 72(3):1568–1579, 2004.
- [133] Mohammed L Garba, Christopher D Pilcher, Andrea L Bingham, Joseph Eron, and Jeffrey A Frelinger. Hiv antigens can induce tgf- $\beta$ 1-producing immunoregulatory cd8+ t cells. *The Journal of Immunology*, 168(5):2247–2254, 2002.
- [134] Lia M Haynes, Carol L Vanderlugt, Mauro C Dal Canto, Roger W Melvold, and Stephen D Miller. Cd8+ t cells from theiler's virus-resistant balb/cbyj mice downregulate pathogenic virus-specific cd4+ t cells. *Journal of neuroimmunology*, 106(1):43–52, 2000.
- [135] Atsushi Kitani, Kevin Chua, Kazuhiko Nakamura, and Warren Strober. Activated self-mhc-reactive t cells have the cytokine phenotype of th3/t regulatory cell 1 t cells. *The Journal of Immunology*, 165(2):691–702, 2000.
- [136] Leonid Gorelik, Stephanie Constant, and Richard A Flavell. Mechanism of transforming growth factor  $\beta$ -induced inhibition of t helper type 1 differentiation. *The Journal of experimental medicine*, 195(11):1499–1505, 2002.
- [137] Kevin W Moore, Rene de Waal Malefyt, Robert L Coffman, and Anne O'Garra. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19(1):683–765, 2001.
- [138] Atsushi Kitani, Ivan Fuss, Kazuhiko Nakamura, Fumiyuki Kumaki, Takashi Usui, and Warren Strober. Transforming growth factor (tgf)- $\beta$ 1-producing regulatory t cells induce smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of tgf- $\beta$ 1-mediated fibrosis. *The Journal of experimental medicine*, 198(8):1179–1188, 2003.
- [139] Keturah E Brown, Gordon J Freeman, E John Wherry, and Arlene H Sharpe. Role of pd-1 in regulating acute infections. *Current opinion in immunology*, 22(3):397–401, 2010.
- [140] Hans-Peter Raué and Mark K Slifka. Pivotal advance: Ctla-4+ t cells exhibit normal antiviral functions during acute viral infection. *Journal of leukocyte biology*, 81(5):1165–1175, 2007.
- [141] Creg J Workman and Dario AA Vignali. Negative regulation of t cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (cd223). *The Journal of Immunology*, 174(2):688–695, 2005.
- [142] Hyun-Tak Jin, Ana C Anderson, Wendy G Tan, Erin E West, Sang-Jun Ha, Koichi Araki, Gordon J Freeman, Vijay K Kuchroo, and Rafi Ahmed. Cooperation of tim-3 and pd-1 in cd8 t-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33):14733–14738, 2010.
- [143] Rhoanne C McPherson, Joanne E Konkel, Catriona T Prendergast, John P Thomson, Raffaele Ottaviano, Melanie D Leech, Oliver Kay, Stephanie EJ Zandee, Claire H Sweenie, David C Wraith, et al. Epigenetic modification of the pd-1 (pd-

- cd1) promoter in effector cd4+ t cells tolerized by peptide immunotherapy. *Elife*, 3:e03416, 2015.
- [144] Pamela M Odorizzi and E John Wherry. Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections. *The Journal of Immunology*, 188(7):2957–2965, 2012.
- [145] E John Wherry. T cell exhaustion. *Nature immunology*, 12(6):492–499, 2011.
- [146] Herbert W Virgin, E John Wherry, and Rafi Ahmed. Redefining chronic viral infection. *Cell*, 138(1):30–50, 2009.
- [147] Mary E Keir, Manish J Butte, Gordon J Freeman, and Arlene H Sharpe. Pd-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 26:677–704, 2008.
- [148] James P Allison and Matthew F Krummel. The yin and yang of t cell costimulation. *Science*, 270(5238):932, 1995.
- [149] C Balzano, N Buonavista, E Rouvier, and P Golstein. Ctla-4 and cd28: similar proteins, neighbouring genes. *International journal of cancer. Supplement= Journal international du cancer. Supplement*, 7:28–32, 1991.
- [150] Peter S Linsley, JL Greene, Patrick Tan, Jeff Bradshaw, Jeffrey A Ledbetter, Claudio Anasetti, and Nitin K Damle. Coexpression and functional cooperation of ctla-4 and cd28 on activated t lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 176(6):1595–1604, 1992.
- [151] Martin K Oaks, Karen M Hallett, R Todd Penwell, Edward C Stauber, Simon J Warren, and Alfred J Tector. A native soluble form of ctla-4. *Cellular immunology*, 201(2):144–153, 2000.
- [152] DM Sansom. Cd28, ctla-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*, 101(2):169–177, 2000.
- [153] Piona Dariavach, Marie-Geneviève Mattéi, Pierre Golstein, and Marie-Paule Lefranc. Human ig superfamily ctla-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human ctla-4 cytoplasmic domains. *European journal of immunology*, 18(12):1901–1905, 1988.
- [154] Xuewu Zhang, Jean-Claude D Schwartz, Steven C Almo, and Stanley G Nathenson. Crystal structure of the receptor-binding domain of human b7-2: insights into organization and signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5):2586–2591, 2003.
- [155] Carin C Stamper, Yan Zhang, James F Tobin, David V Erbe, Shinji Ikemizu, Simon J Davis, Mark L Stahl, Jasbir Sehra, William S Somers, and Lidia Mosyak. Crystal structure of the b7-1/ctla-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature*, 410(6828):608–611, 2001.
- [156] P Anton van der Merwe, Dale L Bodian, Susan Daenke, Peter Linsley, and Simon J Davis. Cd80 (b7-1) binds both cd28 and ctla-4 with a low affinity and very fast kinetics. *The Journal of experimental medicine*, 185(3):393–404, 1997.
- [157] Christopher E Rudd. The reverse stop-signal model for ctla4 function. *Nature Reviews Immunology*, 8(2):153–160, 2008.

- [158] Peter S Linsley, Jeff Bradshaw, JoAnne Greene, Robert Peach, Kelly L Bennett, and Robert S Mittler. Intracellular trafficking of ctla-4 and focal localization towards sites of tcr engagement. *Immunity*, 4(6):535–543, 1996.
- [159] Jackson G Egen and James P Allison. Cytotoxic t lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by tcr signal strength. *Immunity*, 16(1):23–35, 2002.
- [160] Lucy SK Walker and David M Sansom. The emerging role of ctla4 as a cell-extrinsic regulator of t cell responses. *Nature reviews Immunology*, 11(12):852–863, 2011.
- [161] Karen I Mead, Yong Zheng, Claire N Manzotti, Laura CA Perry, Michael KP Liu, Fiona Burke, Dale J Powner, Michael JO Wakelam, and David M Sansom. Exocytosis of ctla-4 is dependent on phospholipase d and adp ribosylation factor-1 and stimulated during activation of regulatory t cells. *The Journal of Immunology*, 174(8):4803–4811, 2005.
- [162] Tooru Shiratori, Shoichiro Miyatake, Hiroshi Ohno, Chiaki Nakaseko, Kaichi Isono, Juan S Bonifacio, and Takashi Saito. Tyrosine phosphorylation controls internalization of ctla-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex ap-2. *Immunity*, 6(5):583–589, 1997.
- [163] Ellen Chuang, Maria-Luisa Alegre, Colin S Duckett, Patricia J Noel, MG Vander Heiden, and Craig B Thompson. Interaction of ctla-4 with the clathrin-associated protein ap50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression. *The Journal of Immunology*, 159(1):144–151, 1997.
- [164] David H Munn, Ebrahim Shafizadeh, John T Attwood, Igor Bondarev, Achal Pashine, and Andrew L Mellor. Inhibition of t cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *The Journal of experimental medicine*, 189(9):1363–1372, 1999.
- [165] Wanjun Chen, Wenwen Jin, and Sharon M Wahl. Engagement of cytotoxic t lymphocyte-associated antigen 4 (ctla-4) induces transforming growth factor  $\beta$  (tgf- $\beta$ ) production by murine cd4+ t cells. *The Journal of experimental medicine*, 188(10):1849–1857, 1998.
- [166] Craig B Thompson and James P Allison. The emerging role of ctla-4 as an immune attenuator. *Immunity*, 7(4):445–450, 1997.
- [167] Hironori Ueda, Joanna MM Howson, Laura Esposito, Joanne Heward, Giselle Chamberlain, Daniel B Rainbow, Kara MD Hunter, Annabel N Smith, Gianfranco Di Genova, Mathias H Herr, et al. Association of the t-cell regulatory gene ctla4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423(6939):506–511, 2003.
- [168] Martin K Oaks and Karen M Hallett. Cutting edge: a soluble form of ctla-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *The Journal of Immunology*, 164(10):5015–5018, 2000.
- [169] Omar S Qureshi, Yong Zheng, Kyoko Nakamura, Kesley Attridge, Claire Manzotti, Emily M Schmidt, Jennifer Baker, Louisa E Jeffery, Satdip Kaur, Zoe Briggs, et al. Trans-endocytosis of cd80 and cd86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of ctla-4. *Science*, 332(6029):600–603, 2011.

- [170] Lukas Cederbom, Håkan Hall, and Fredrik Ivars. Cd4+ cd25+ regulatory t cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European journal of immunology*, 30(6):1538–1543, 2000.
- [171] Maria-Luisa Alegre, Kenneth A Frauwirth, and Craig B Thompson. T-cell regulation by cd28 and ctla-4. *Nature Reviews Immunology*, 1(3):220–228, 2001.
- [172] Ellen Chuang, Timothy S Fisher, Rodney W Morgan, Michael D Robbins, James M Duerr, Matthew G Vander Heiden, Joseph P Gardner, John E Hambor, Mark J Neveu, and Craig B Thompson. The cd28 and ctla-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase pp2a. *Immunity*, 13(3):313–322, 2000.
- [173] Victor L Perez, Luk Van Parijs, Andre Biuckians, Xin Xiao Zheng, Terry B Strom, and Abul K Abbas. Induction of peripheral t cell tolerance in vivo requires ctla-4 engagement. *Immunity*, 6(4):411–417, 1997.
- [174] Helga Schneider and Christopher E Rudd. Tyrosine phosphatase shp-2 binding to ctla-4: absence of direct yvkm/yfip motif recognition. *Biochemical and biophysical research communications*, 269(1):279–283, 2000.
- [175] Concepcion Revilla Calvo, Derk Amsen, and Ada M Kruisbeek. Cytotoxic t lymphocyte antigen 4 (ctla-4) interferes with extracellular signal-regulated kinase (erk) and jun nh2-terminal kinase (jnk) activation, but does not affect phosphorylation of t cell receptor  $\zeta$  and zap70. *The Journal of experimental medicine*, 186(10):1645–1653, 1997.
- [176] Christina Olsson, Kristian Riebeck, Mikael Dohlsten, and Erik Michaëlsson. Ctla-4 ligation suppresses cd28-induced nf- $\kappa$ b and ap-1 activity in mouse t cell blasts. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20):14400–14405, 1999.
- [177] J Henry Fraser, Mercedes Rincón, Kathy D McCoy, and Graham Le Gros. Ctla4 ligation attenuates ap-1, nfat and nf- $\kappa$ b activity in activated t cells. *European journal of immunology*, 29(3):838–844, 1999.
- [178] Matthew F Krummel and James P Allison. Ctla-4 engagement inhibits il-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting t cells. *The Journal of experimental medicine*, 183(6):2533–2540, 1996.
- [179] Rebecca J Greenwald, Mariette A Oosterwegel, Diane van der Woude, Anup Kubal, Didier A Mandelbrot, Vassiliki A Boussiotis, and Arlene H Sharpe. Ctla-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. *European journal of immunology*, 32(2):366–373, 2002.
- [180] Monika C Brunner, Cynthia A Chambers, Francis Ka-Ming Chan, Jeff Hanke, Astar Winoto, and James P Allison. Ctla-4-mediated inhibition of early events of t cell proliferation. *The Journal of Immunology*, 162(10):5813–5820, 1999.
- [181] Paul Waterhouse, Josef M Penninger, Emma Timms, Andrew Wakeham, Arda Shahinian, Kelvin P Lee, Craig B Thompson, Henrik Griesser, and Tak W Mak. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in ctla-4. *Science*, 270(5238):985–988, 1995.
- [182] Hye Sun Kuehn, Weiming Ouyang, Bernice Lo, Elissa K Deenick, Julie E Niemela,

- Danielle T Avery, Jean-Nicolas Schickel, Dat Q Tran, Jennifer Stoddard, Yu Zhang, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in *ctla4*. *Science*, 345(6204):1623–1627, 2014.
- [183] Lawrence Fong and Eric J Small. Anti-cytotoxic t-lymphocyte antigen-4 antibody: the first in an emerging class of immunomodulatory antibodies for cancer treatment. *Journal of clinical oncology*, 26(32):5275–5283, 2008.
- [184] Virginia A Pedicord, Welby Montalvo, Ingrid M Leiner, and James P Allison. *Single dose of anti-CTLA-4 enhances CD8+ T-cell memory formation, function, and maintenance*. PhD thesis, 2011.
- [185] Michaela L Murphy, Sara EJ Cotterell, Patricia MA Gorak, Christian R Engwerda, and Paul M Kaye. Blockade of *ctla-4* enhances host resistance to the intracellular pathogen, *leishmania donovani*. *The Journal of Immunology*, 161(8):4153–4160, 1998.
- [186] Daniel L Barber, E John Wherry, David Masopust, Baogong Zhu, James P Allison, Arlene H Sharpe, Gordon J Freeman, and Rafi Ahmed. *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. PhD thesis, 2006.
- [187] Xuewu Zhang, Jean-Claude D Schwartz, Xiaoling Guo, Sumeena Bhatia, Erhu Cao, Lieping Chen, Zhong-Yin Zhang, Michael A Edidin, Stanley G Nathenson, and Steven C Almo. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity*, 20(3):337–347, 2004.
- [188] Eric O Long. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annual review of immunology*, 17(1):875–904, 1999.
- [189] Svetlana P Sidorenko and Edward A Clark. The dual-function *cd150* receptor subfamily: the viral attraction. *Nature immunology*, 4(1):19–24, 2003.
- [190] Rafi Ahmed and Tasuku Honjo. *Negative co-receptors and ligands*, volume 350. Springer Science & Business Media, 2011.
- [191] Manish J Butte, Mary E Keir, Theresa B Phamduy, Arlene H Sharpe, and Gordon J Freeman. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the *b7-1* costimulatory molecule to inhibit t cell responses. *Immunity*, 27(1):111–122, 2007.
- [192] Yasutoshi Agata, Akemi Kawasaki, Hiroyuki Nishimura, Yasumasa Ishida, Takeshi Tsubat, Hideo Yagita, and Tasuku Honjo. Expression of the *pd-1* antigen on the surface of stimulated mouse t and b lymphocytes. *International immunology*, 8(5):765–772, 1996.
- [193] Tomohide Yamazaki, Hisaya Akiba, Hideyuki Iwai, Hironori Matsuda, Mami Aoki, Yuka Tanno, Tahiro Shin, Haruo Tsuchiya, Drew M Pardoll, Ko Okumura, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine t cells and *apc*. *The Journal of Immunology*, 169(10):5538–5545, 2002.
- [194] Jens M Chemnitz, Richard V Parry, Kim E Nichols, Carl H June, and James L Riley. *Shp-1* and *shp-2* associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human t cell stimulation, but only receptor

- ligation prevents t cell activation. *The Journal of Immunology*, 173(2):945–954, 2004.
- [195] Susumu Nakae, Hajime Suto, Motoyasu Iikura, Maki Kakurai, Jonathon D Sedgwick, Mindy Tsai, and Stephen J Galli. Mast cells enhance t cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted tnf. *The Journal of Immunology*, 176(4):2238–2248, 2006.
- [196] Ben Youngblood, J Scott Hale, and Rafi Ahmed. T-cell memory differentiation: insights from transcriptional signatures and epigenetics. *Immunology*, 139(3):277–284, 2013.
- [197] Xuemei Zhong, Joseph R Tumang, Wenda Gao, Chunyan Bai, and Thomas L Rothstein. Pd-12 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to b1 cells enriched for vh11/vh12 and phosphatidylcholine binding. *European journal of immunology*, 37(9):2405–2410, 2007.
- [198] Hiroyuki Nishimura, Masato Nose, Hiroshi Hiai, Nagahiro Minato, and Tasuku Honjo. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the pd-1 gene encoding an itim motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11(2):141–151, 1999.
- [199] Hiroyuki Nishimura, Taku Okazaki, Yoshimasa Tanaka, Kazuki Nakatani, Masatake Hara, Akira Matsumori, Shigetake Sasayama, Akira Mizoguchi, Hiroshi Hiai, Nagahiro Minato, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in pd-1 receptor-deficient mice. *Science*, 291(5502):319–322, 2001.
- [200] Loise M Francisco, Peter T Sage, and Arlene H Sharpe. The pd-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological reviews*, 236(1):219–242, 2010.
- [201] Richard V Parry, Jens M Chemnitz, Kenneth A Frauwirth, Anthony R Lanfranco, Inbal Braunstein, Sumire V Kobayashi, Peter S Linsley, Craig B Thompson, and James L Riley. Ctl4 and pd-1 receptors inhibit t-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and cellular biology*, 25(21):9543–9553, 2005.
- [202] Daniel E Kaufmann and Bruce D Walker. Pd-1 and ctla-4 inhibitory cosignaling pathways in hiv infection and the potential for therapeutic intervention. *The Journal of Immunology*, 182(10):5891–5897, 2009.
- [203] Mario Sznol, Harriet M Kluger, F Stephen Hodi, David F McDermott, Richard D Carvajal, Donald P Lawrence, Suzanne Louise Topalian, Michael B Atkins, John D Powderly, William Howard Sharfman, et al. Survival and long-term follow-up of safety and response in patients (pts) with advanced melanoma (mel) in a phase i trial of nivolumab (anti-pd-1; bms-936558; ono-4538). In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, volume 31, page CRA9006, 2013.
- [204] Javier O Jurado, Ivana B Alvarez, Virginia Pasquinelli, Gustavo J Martínez, María F Quiroga, Eduardo Abbate, Rosa M Musella, H Eduardo Chuluyan, and Verónica E García. Programmed death (pd)-1: Pd-ligand 1/pd-ligand 2 pathway inhibits t cell effector functions during human tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 181(1):116–125, 2008.
- [205] Eszter Lázár-Molnár, Bing Chen, Kari A Sweeney, Emilie J Wang, Weijun Liu, Juan Lin, Steven A Porcelli, Steven C Almo, Stanley G Nathenson, and William R

- Jacobs. Programmed death-1 (pd-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(30):13402–13407, 2010.
- [206] Laurent Monney, Catherine A Sabatos, Jason L Gaglia, Akemi Ryu, Hanspeter Waldner, Tatyana Chernova, Stephen Manning, Edward A Greenfield, Anthony J Coyle, Raymond A Sobel, et al. Th1-specific cell surface protein tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, 415(6871):536–541, 2002.
- [207] Mohsen Khademi, Zsolt Illés, Alexander W Gielen, Monica Marta, Naruhiko Takazawa, Claire Baecher-Allan, Lou Brundin, Jan Hannerz, Claes Martin, Robert A Harris, et al. T cell ig-and mucin-domain-containing molecule-3 (tim-3) and tim-1 molecules are differentially expressed on human th1 and th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*, 172(11):7169–7176, 2004.
- [208] Ana C Anderson, David E Anderson, Lisa Bregoli, William D Hastings, Nasim Kassam, Charles Lei, Rucha Chandwaskar, Jozsef Karman, Ee W Su, Mitsuomi Hirashima, et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor tim-3 expressed on innate immune cells. *Science*, 318(5853):1141–1143, 2007.
- [209] Chen Zhu, Ana C Anderson, Anna Schubart, Huabao Xiong, Jaime Imitola, Samia J Khoury, Xin Xiao Zheng, Terry B Strom, and Vijay K Kuchroo. The tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates t helper type 1 immunity. *Nature immunology*, 6(12):1245–1252, 2005.
- [210] Alberto Sánchez-Fueyo, Jane Tian, Dominic Picarella, Christoph Domenig, Xin Xiao Zheng, Catherine A Sabatos, Natasha Manlongat, Orissa Bender, Thomas Kamradt, Vijay K Kuchroo, et al. Tim-3 inhibits t helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nature immunology*, 4(11):1093–1101, 2003.
- [211] R Brad Jones, Lishomwa C Ndhlovu, Jason D Barbour, Prameet M Sheth, Aashish R Jha, Brian R Long, Jessica C Wong, Malathy Satkunarajah, Marc Schweneker, Joan M Chapman, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional t cells with highly elevated frequencies in progressive hiv-1 infection. *The Journal of experimental medicine*, 205(12):2763–2779, 2008.
- [212] Lucy Golden-Mason, Brent E Palmer, Nasim Kassam, Lisa Townshend-Bulson, Stephen Livingston, Brian J McMahon, Nicole Castelblanco, Vijay Kuchroo, David R Gretch, and Hugo R Rosen. Negative immune regulator tim-3 is overexpressed on t cells in hepatitis c virus infection and its blockade rescues dysfunctional cd4+ and cd8+ t cells. *Journal of virology*, 83(18):9122–9130, 2009.
- [213] P Bork, L Holm, and C Sander. The immunoglobulin fold: structural classification, sequence patterns and common core. *Journal of molecular biology*, 242(4):309–320, 1994.
- [214] Erhu Cao, Xingxing Zang, Udupi A Ramagopal, Arunika Mukhopadhyaya, Alexander Fedorov, Elena Fedorov, Wendy D Zencheck, Jeffrey W Lary, James L Cole, Haiteng



- Deng, et al. T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity*, 26(3):311–321, 2007.
- [215] César Santiago, Angela Ballesteros, Cecilia Tami, Laura Martínez-Muñoz, Gerardo G Kaplan, and José M Casasnovas. Structures of t cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the tim receptor family. *Immunity*, 26(3):299–310, 2007.
- [216] Gabriel A Rabinovich and Marta A Toscano. Turning’sweet’ on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 9(5):338–352, 2009.
- [217] Tadaatsu Imaizumi, Mika Kumagai, Naoko Sasaki, Hidekachi Kurotaki, Fumiaki Mori, Masako Seki, Nozomu Nishi, Koji Fujimoto, Kunikazu Tanji, Takeo Shibata, et al. Interferon- $\gamma$  stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *Journal of leukocyte biology*, 72(3):486–491, 2002.
- [218] Masafumi Nakayama, Hisaya Akiba, Kazuyoshi Takeda, Yuko Kojima, Masaaki Hashiguchi, Miyuki Azuma, Hideo Yagita, and Ko Okumura. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood*, 113(16):3821–3830, 2009.
- [219] Peter R Wilker, John R Sedy, Vadim Grigura, Theresa L Murphy, and Kenneth M Murphy. Evidence for carbohydrate recognition and homotypic and heterotypic binding by the tim family. *International immunology*, 19(6):763–773, 2007.
- [220] Vijay K Kuchroo, Dale T Umetsu, Rosemarie H DeKruyff, and Gordon J Freeman. The tim gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 3(6):454–462, 2003.
- [221] Philipp S van de Weyer, Michael Muehlfeit, Christoph Klose, Joseph V Bonventre, Gerd Walz, and E Wolfgang Kuehn. A highly conserved tyrosine of tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochemical and biophysical research communications*, 351(2):571–576, 2006.
- [222] William D Hastings, David E Anderson, Nasim Kassam, Ken Koguchi, Edward A Greenfield, Sally C Kent, Xin Xiao Zheng, Terry B Strom, David A Hafler, and Vijay K Kuchroo. Tim-3 is expressed on activated human cd4+ t cells and regulates th1 and th17 cytokines. *European journal of immunology*, 39(9):2492–2501, 2009.
- [223] Shiki Takamura, Sachiyo Tsuji-Kawahara, Hideo Yagita, Hisaya Akiba, Mayumi Sakamoto, Tomomi Chikaishi, Maiko Kato, and Masaaki Miyazawa. Premature terminal exhaustion of friend virus-specific effector cd8+ t cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *The Journal of Immunology*, 184(9):4696–4707, 2010.
- [224] Frederic Triebel, Setsuko Jitsukawa, Elena Baixeras, SERGIO Roman-Roman, Catherine Genevee, EVANI Viegas-Pequignot, and T Hercend. Lag-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to cd4. *The Journal of experimental medicine*, 171(5):1393–1405, 1990.
- [225] Creg J Workman and Dario AA Vignali. The cd4-related molecule, lag-3 (cd223), regulates the expansion of activated t cells. *European journal of immunology*, 33(4):970–979, 2003.

- [226] Joseph F Grosso, Cristin C Kelleher, Timothy J Harris, Charles H Maris, Edward L Hipkiss, Angelo De Marzo, Robert Anders, George Netto, Derese Getnet, Tullia C Bruno, et al. Lag-3 regulates cd8+ t cell accumulation and effector function in murine self-and tumor-tolerance systems. *The Journal of clinical investigation*, 117(117 (11)):3383–3392, 2007.
- [227] Malgorzata Kisielow, Jan Kisielow, Giuseppina Capoferri-Sollami, and Klaus Karjalainen. Expression of lymphocyte activation gene 3 (lag-3) on b cells is induced by t cells. *European journal of immunology*, 35(7):2081–2088, 2005.
- [228] Creg J Workman, Linda S Cauley, In-Jeong Kim, Marcia A Blackman, David L Woodland, and Dario AA Vignali. Lymphocyte activation gene-3 (cd223) regulates the size of the expanding t cell population following antigen activation in vivo. *The Journal of Immunology*, 172(9):5450–5455, 2004.
- [229] Sigrid Hannier, Muriel Tournier, Georges Bismuth, and Frédéric Triebel. Cd3/tcr complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit cd3/tcr signaling. *The Journal of Immunology*, 161(8):4058–4065, 1998.
- [230] Noah S Butler, Jacqueline Moebius, Lecia L Pewe, Boubacar Traore, Ogobara K Doumbo, Lorraine T Tygrett, Thomas J Waldschmidt, Peter D Crompton, and John T Harty. Therapeutic blockade of pd-11 and lag-3 rapidly clears established blood-stage plasmodium infection. *Nature immunology*, 13(2):188–195, 2012.
- [231] Akira Shirai, Phillip J Catanzaro, S Michael Phillips, and Joseph V Osterman. Host defenses in experimental scrub typhus: role of cellular immunity in heterologous protection. *Infection and immunity*, 14(1):39–46, 1976.
- [232] Federica Sallusto, Jens Geginat, and Antonio Lanzavecchia. Central memory and effector memory t cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 22:745–763, 2004.
- [233] Tsuguo Kuwata. Analysis of immunity in experimental tsutsugamushi disease. *The Journal of Immunology*, 68(2):115–120, 1952.
- [234] Jason T Blackard and Kenneth E Sherman. Hepatitis c virus coinfection and superinfection. *Journal of Infectious Diseases*, 195(4):519–524, 2007.
- [235] Y Choi, K-S Kim, T-Y Kim, H-S Cheong, and B-Y Ahn. Long-term egg-yolk adaptation of the orientia tsutsugamushi for preparation of a formalinized immunogen. *Vaccine*, 24(9):1438–1445, 2006.
- [236] Gh Eisenberg and Joseph V Osterman. Experimental scrub typhus immunogens: gamma-irradiated and formalinized rickettsiae. *Infection and immunity*, 15(1):124–131, 1977.
- [237] Margarida Saraiva and Anne O’Garra. The regulation of il-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3):170–181, 2010.
- [238] CM Hawrylowicz and A O’garra. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory t cells in allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology*, 5(4):271–283, 2005.
- [239] Anne O’Garra, Franck J Barrat, Antonio G Castro, Alain Vicari, and Catherine

- Hawrylowicz. Strategies for use of il-10 or its antagonists in human disease. *Immunological reviews*, 223(1):114–131, 2008.
- [240] Giorgio Trinchieri. Interleukin-10 production by effector t cells: Th1 cells show self control. *The Journal of experimental medicine*, 204(2):239–243, 2007.
- [241] Maria Grazia Roncarolo, Silvia Gregori, Manuela Battaglia, Rosa Bacchetta, Katharina Fleischhauer, and Megan K Levings. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory t cells in rodents and humans. *Immunological reviews*, 212(1):28–50, 2006.
- [242] Craig L Maynard and Casey T Weaver. Diversity in the contribution of interleukin-10 to t-cell-mediated immune regulation. *Immunological reviews*, 226(1):219–233, 2008.
- [243] Kevin J Maloy and Fiona Powrie. Regulatory t cells in the control of immune pathology. *Nature immunology*, 2(9):816–822, 2001.
- [244] Martin A Schwarz, Linda D Hamilton, Lisa Tardelli, Satwant K Narula, and Lee M Sullivan. Stimulation of cytolytic activity by interleukin-10. *Journal of immunotherapy*, 16(2):95–104, 1994.
- [245] Mark R Walter, William T Windsor, Tattanahalli L Nagabhushan, Daniel J Lundell, Charles A Lunn, Paul J Zauodny, and Satwant K Narula. Crystal structure of a complex between interferon- $\gamma$  and its soluble high-affinity receptor. *Nature*, (376):230–235, 2002.
- [246] Wf Chen and Albert Zlotnik. Il-10: a novel cytotoxic t cell differentiation factor. *The Journal of Immunology*, 147(2):528–534, 1991.
- [247] Hervé Groux, Mike Bigler, Jan E de Vries, and Maria-Grazia Roncarolo. Inhibitory and stimulatory effects of il-10 on human cd8+ t cells. *The Journal of Immunology*, 160(7):3188–3193, 1998.
- [248] Alessandro D Santin, Paul L Hermonat, Antonella Ravaggi, Stefania Bellone, Sergio Pecorelli, Juan J Roman, Groesbeck P Parham, and Martin J Cannon. Interleukin-10 increases th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific cd8+ cytotoxic t lymphocytes. *Journal of virology*, 74(10):4729–4737, 2000.
- [249] David F Fiorentino, Martha W Bond, and TR Mosmann. Two types of mouse t helper cell. iv. th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by th1 clones. *The Journal of experimental medicine*, 170(6):2081–2095, 1989.
- [250] Rance K Sellon, Susan Tonkonogy, Michael Schultz, Levinus A Dieleman, Wetonia Grenther, ED Balish, Donna M Rennick, and R Balfour Sartor. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and immunity*, 66(11):5224–5231, 1998.
- [251] Mette Ejrnaes, Christophe M Filippi, Marianne M Martinic, Eleanor M Ling, Lisa M Togher, Shane Crotty, and Matthias G von Herrath. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *The Journal of experimental medicine*, 203(11):2461–2472, 2006.

- [252] David G Brooks, Matthew J Trifilo, Kurt H Edelmann, Luc Teyton, Dorian B McGavern, and Michael BA Oldstone. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nature medicine*, 12(11):1301–1309, 2006.
- [253] Ching Li, Inés Corraliza, and Jean Langhorne. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in plasmodium chabaudi chabaudi infection in mice. *Infection and Immunity*, 67(9):4435–4442, 1999.
- [254] Ricardo T Gazzinelli, Maria Wysocka, Sara Hieny, Tanya Scharon-Kersten, Allen Cheever, R Kühn, W Müller, Giorgio Trinchieri, and Alan Sher. In the absence of endogenous il-10, mice acutely infected with toxoplasma gondii succumb to a lethal immune response dependent on cd4+ t cells and accompanied by overproduction of il-12, ifn-gamma and tnf-alpha. *The Journal of Immunology*, 157(2):798–805, 1996.
- [255] Jean-Louis Mege, Soraya Meghari, Amélie Honstette, Christian Capo, and Didier Raoult. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *The Lancet infectious diseases*, 6(9):557–569, 2006.
- [256] Soraya Meghari, Yassina Bechah, Christian Capo, Hubert Lepidi, Didier Raoult, Peter J Murray, and Jean-Louis Mege. Persistent coxiella burnetii infection in mice overexpressing il-10: an efficient model for chronic q fever pathogenesis. *PLoS Pathog*, 4(2):e23–e23, 2008.
- [257] Charles F Anderson, Mohammed Oukka, Vijay J Kuchroo, and David Sacks. Cd4+ cd25- foxp3- th1 cells are the source of il-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine*, 204(2):285–297, 2007.
- [258] Mi-Jeong Kim, Mee-Kyung Kim, and Jae-Seung Kang. Orientia tsutsugamushi inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$  production by inducing interleukin 10 secretion in murine macrophages. *Microbial pathogenesis*, 40(1):1–7, 2006.
- [259] Stefanie Kramme, Nguyen Dinh Khoa, Egbert Tannich, Jan Rybniker, Bernhard Fleischer, Christian Drost, Marcus Panning, et al. Orientia tsutsugamushi bacteremia and cytokine levels in vietnamese scrub typhus patients. *Journal of clinical microbiology*, 47(3):586–589, 2009.
- [260] Young-Sang Koh, Ji-Hyun Yun, Seung-Yong Seong, Myung-Sik Choi, and Ik-Sang Kim. Chemokine and cytokine production during orientia tsutsugamushi infection in mice. *Microbial pathogenesis*, 36(1):51–57, 2004.
- [261] Erwin Bohn, Jurgen Heesemann, Stefan Ehlers, and Ingo B Autenrieth. Early gamma interferon mrna expression is associated with resistance of mice against yersinia enterocolitica. *Infection and immunity*, 62(7):3027–3032, 1994.
- [262] Stefan Ehlers, Me Mielke, T Blankenstein, and H Hahn. Kinetic analysis of cytokine gene expression in the livers of naive and immune mice infected with listeria monocytogenes. the immediate early phase in innate resistance and acquired immunity. *The Journal of Immunology*, 149(9):3016–3022, 1992.
- [263] Sandrine Pie, Peggy Matsiota-Bernard, Paolo Truffa-Bachi, and Charles Nauciel. Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in innately susceptible and

- resistant mice during the early phase of salmonella typhimurium infection. *Infection and immunity*, 64(3):849–854, 1996.
- [264] Hervé Groux, Anne O’Garra, Mike Bigler, Matthieu Rouleau, Svetlana Antonenko, Jan E de Vries, and Maria Grazia Roncarolo. A cd4+ t-cell subset inhibits antigen-specific t-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652):737–742, 1997.
- [265] Rachel H McMahan, Lucy Golden-Mason, Michael I Nishimura, Brian J McMahon, Michael Kemper, Todd M Allen, David R Gretch, and Hugo R Rosen. Tim-3 expression on pd-1+ hcv-specific human ctls is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *The Journal of clinical investigation*, 120(12):4546, 2010.
- [266] Seng-Ryong Woo, Meghan E Turnis, Monica V Goldberg, Jaishree Bankoti, Mark Selby, Christopher J Nirschl, Matthew L Bettini, David M Gravano, Peter Vogel, Chih Long Liu, et al. Immune inhibitory molecules lag-3 and pd-1 synergistically regulate t-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer research*, 72(4):917–927, 2012.
- [267] Kevin N Couper, Daniel G Blount, and Eleanor M Riley. Il-10: the master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology*, 180(9):5771–5777, 2008.
- [268] Robert Thimme, Victor Appay, Marie Koschella, Elisabeth Panther, Evelyn Roth, Andrew D Hislop, Alan B Rickinson, Sarah L Rowland-Jones, Hubert E Blum, and Hanspeter Pircher. Increased expression of the nk cell receptor klrp1 by virus-specific cd8 t cells during persistent antigen stimulation. *Journal of Virology*, 79(18):12112–12116, 2005.
- [269] David Voehringer, Claudine Blaser, Pierre Brawand, David H Raulet, Thomas Hanke, and Hanspeter Pircher. Viral infections induce abundant numbers of senescent cd8 t cells. *The Journal of Immunology*, 167(9):4838–4843, 2001.
- [270] Michael L Dustin and Timothy A Springer. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through lfa-1. *Nature*, 341(6243):619–624, 1989.
- [271] Tina O Bose, Quynh-Mai Pham, Evan R Jellison, Juliette Mouries, Christie M Ballantyne, and Leo Lefrançois. Cd11a regulates effector cd8 t cell differentiation and central memory development in response to infection with listeria monocytogenes. *Infection and immunity*, 81(4):1140–1151, 2013.
- [272] Shamik Ghosh, Alissa A Chackerian, Christina M Parker, Christie M Ballantyne, and Samuel M Behar. The lfa-1 adhesion molecule is required for protective immunity during pulmonary mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of Immunology*, 176(8):4914–4922, 2006.
- [273] Allan J Zajac, John M Dye, and Daniel G Quinn. Control of lymphocytic choriomeningitis virus infection in granzyme b deficient mice. *Virology*, 305(1):1–9, 2003.
- [274] Amandine Legat, Daniel E Speiser, Hanspeter Pircher, Dietmar Zehn, and Silvia A Fuertes Marraco. Inhibitory receptor expression depends more dominantly on differentiation and activation than exhaustion of human cd8 t cells. *Frontiers in immunology*, 4, 2013.

- [275] Felipe Bedoya, Guang-Shing Cheng, Abigail Leibow, Nardine Zakhary, Katherine Weissler, Victoria Garcia, Malinda Aitken, Elizabeth Kropf, David S Garlick, E John Wherry, et al. Viral antigen induces differentiation of foxp3+ natural regulatory t cells in influenza virus-infected mice. *The Journal of Immunology*, 190(12):6115–6125, 2013.
- [276] Yasmine Belkaid and Kristin Tarbell. Regulatory t cells in the control of host-microorganism interactions. *Annual review of immunology*, 27:551–589, 2009.
- [277] Jun Wei, Omar Duramad, Olivia A Perng, Steven L Reiner, Yong-Jun Liu, and F Xiao-Feng Qin. Antagonistic nature of t helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of foxp3+ regulatory t cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46):18169–18174, 2007.
- [278] JoAnne L Flynn, John Chan, Karla J Triebold, Dyana K Dalton, Timothy A Stewart, and Barry R Bloom. An essential role for interferon gamma in resistance to mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of experimental medicine*, 178(6):2249–2254, 1993.
- [279] Guillaume Oldenhove, Nicolas Bouladoux, Elizabeth A Wohlfert, Jason A Hall, David Chou, Shaun O’Brien, Rebecca Blank, Erika Lamb, Sundar Natarajan, Robin Kastenmayer, et al. Decrease of foxp3+ treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity*, 31(5):772–786, 2009.
- [280] Iris K Gratz and Daniel J Campbell. Organ-specific and memory treg cells: specificity, development, function, and maintenance. *Frontiers in immunology*, 5, 2014.
- [281] Jochen Huehn and Alf Hamann. Homing to suppress: address codes for treg migration. *Trends in immunology*, 26(12):632–636, 2005.
- [282] Kathy D McCoy and Graham Le Gros. The role of ctla-4 in the regulation of t cell immune responses. *Immunology and cell biology*, 77(1):1–10, 1999.
- [283] Matthew F Krummel and James P Allison. Cd28 and ctla-4 have opposing effects on the response of t cells to stimulation. *The journal of experimental medicine*, 182(2):459–465, 1995.
- [284] Theresa L Walunas, Deborah J Lenschow, Christina Y Bakker, Peter S Linsley, Gordon J Freeman, Jonathan M Green, Craig B Thompson, and Jeffrey A Bluestone. Ctla-4 can function as a negative regulator of t cell activation. *Immunity*, 1(5):405–413, 1994.
- [285] Elizabeth R Kearney, Theresa L Walunas, Robert W Karr, Phillip A Morton, Dennis Y Loh, Jeffrey A Bluestone, and Marc K Jenkins. Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific cd4+ t cells in vivo is dependent on cd28 costimulation and inhibited by ctla-4. *The Journal of Immunology*, 155(3):1032–1036, 1995.
- [286] Matthew F Krummel, Timothy J Sullivan, and James P Allison. Superantigen responses and co-stimulation: Cd28 and ctla-4 have opposing effects on t cell expansion in vitro and in vivo. *International immunology*, 8(4):519–523, 1996.

- [287] Lawrence H Boise, Patricia J Noel, and Craig B Thompson. Cd28 and apoptosis. *Current opinion in immunology*, 7(5):620–625, 1995.
- [288] Eric Ghigo, Christian Capo, Didier Raoult, and Jean-Louis Mege. Interleukin-10 stimulates coxiella burnetiireplication in human monocytes through tumor necrosis factor down-modulation: Role in microbicidal defect of q fever. *Infection and immunity*, 69(4):2345–2352, 2001.
- [289] Hanyu Zeng, Rong Zhang, Boquan Jin, and Lihua Chen. Type 1 regulatory t cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cellular & molecular immunology*, 12:566–571, 2015.
- [290] David R Park and Shawn J Skerrett. Il-10 enhances the growth of legionella pneumophila in human mononuclear phagocytes and reverses the protective effect of ifn-gamma: differential responses of blood monocytes and alveolar macrophages. *The Journal of Immunology*, 157(6):2528–2538, 1996.
- [291] Jie Sun, Rajat Madan, Christopher L Karp, and Thomas J Braciale. Effector t cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing il-10. *Nature medicine*, 15(3):277–284, 2009.

## Danksagung

In erster Linie geht mein Dank an **Prof. Dr. Bernhard Fleischer** für die Bereitstellung des Themas in der Abteilung Immunologie am Bernhard-Nocht-Institut und die Begutachtung dieser Arbeit.

Auch bei **Prof. Dr. Julia Kehr** möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich für die kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

**Dr. Christian Keller** danke ich für die Betreuung dieser Arbeit auch vom fernen Marburg aus. Trotz der großen Entfernung war stets ein konstruktiver und zielführender Austausch über die Daten, auch zu später Stunde, möglich.

Meinen ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe möchte ich für die gemeinsamen ersten zwei Jahre danken. Ein besonderer Dank geht dabei an **Julia Forisch**, die mit ihrer herzlichen Art immer positive Stimmung verbreitet hat und **David Wozniak** für sein unermüdliches Engagement und die Unterstützung bei einigen Experimenten.

**Christiane Steeg** danke ich für die Bereitstellung des CTLA-4 Hybridoms, die Unterstützung bei der Herstellung des Antikörpers und allen anderen auftauchenden Fragen.

Ich danke allen Kollegen der Abteilung Immunologie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, so dass eine fehlende Arbeitsgruppe „fast“ kompensiert werden konnte. Ein besonderer Dank geht dabei an **Dr. Anke Osterloh** und **Dr. Thomas Jacobs**.

Ganz besonders möchte ich mich bei den „Jacob-Sisters“ **Annemieke Abel**, **Franziska Muskate**, **Dr. Julie Sellau**, **Dr. Catherine Fuentes** und **Rosa Grote-Galvez** für die „inoffizielle Adoption“ in ihre Arbeitsgruppe bedanken. Ein genauso großes Dankeschön geht an meine Büromitbewohnerinnen **Kristin Moderzynski** und **Stefanie Papp**, die für ein besonders tolles Arbeitsklima im Büro gesorgt haben. Ihr Mädels habt dafür gesorgt, dass ich mich auch ohne eigene Arbeitsgruppe nicht alleine gefühlt habe und immer einen Ansprechpartner gefunden habe. Vielen vielen Dank. Meine Erwartungen an zukünftige Kollegen sind, dank euch, nun ziemlich hoch.

**Sabrina Nabert** möchte ich für die unermüdliche Bereitschaft danken, diese Arbeit Korrektur zu lesen.

Ein besonderer Dank geht auch an **meine Eltern** und **meinen Bruder**, ohne die ich diesen Weg nicht hätte gehen können. Danke, dass ihr mich immer unterstützt.

Ein ebenso großer Dank gilt auch **Helge**, der alle Höhen und Tiefen geduldig mit mir ertragen hat, mich liebevoll unterstützt hat und durch viele Aufmunterungsprogramme dafür gesorgt hat, dass ich immer wieder neue Kraft sammeln konnte.