

**Charakterisierung protektiver T-Zell-vermittelter
Immunmechanismen bei der Infektion mit
Rickettsia typhi (Wolbach und Todd, 1920)
in der Maus (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kristin Moderzynski

Hamburg, Mai 2017

1. Gutachterin: Dr. Anke Osterloh

2. Gutachterin: Prof. Dr. Julia Kehr

Vorsitzende der Prüfungskommission: Prof. Dr. Julia Kehr

Tag der Disputation: 30.06.2017

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen – 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 02.05.2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'K. Moderzynski', is written over a horizontal line.

K. Moderzynski

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xi
Abstract	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Die Familie der Rickettsien (<i>Rickettsiaceae</i>)	1
1.2 <i>Rickettsia typhi</i>	2
1.2.1 Lebensweise von <i>R. typhi</i>	2
1.2.2 Das endemische Fleckfieber - Symptome, Therapie und Epidemiologie .	4
1.3 Die Immunantwort gegenüber Rickettsien	5
1.3.1 Mausmodelle für die Infektion mit Rickettsien	5
1.3.2 Die angeborene Immunantwort gegenüber Rickettsien	8
1.3.3 Die adaptive Immunantwort gegenüber Rickettsien	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit	13
2 Material	15
2.1 Geräte	15
2.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.3 Chemikalien und Reagenzien	17
2.4 Kits	18
2.5 Lösungen und Puffer	18
2.6 Antikörper	20
2.7 Proteine	21
2.8 Zelllinien	21
2.9 Bakterienstämme	21
2.10 Nukleinsäuren	21
2.11 Mäusestämme und -linien	22
2.12 Software	22
3 Methoden	23
3.1 Zellbiologische Methoden	23
3.1.1 Zellzahlbestimmung	23
3.1.2 Kultivierung von L929-Zellen	23

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Kultivierung und Isolierung von <i>R. typhi</i>	23
3.1.4	Präparation muriner Milzzellen	24
3.1.5	Präparation muriner Gehirnzellen	24
3.1.6	Anreicherung von T-Zellen aus der Milz	24
3.1.7	Generierung von Knochenmarkmakrophagen	25
3.1.8	Infektion von Knochenmarkmakrophagen und Kokultivierung mit T-Zellen und rekombinanten Zytokinen <i>in vitro</i>	25
3.2	Molekularbiologische Methoden	26
3.2.1	Bestimmung der GPT-Konzentration im Serum	26
3.2.2	Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum und im Zellkulturüber- stand	26
3.2.3	Detektion von Stickstoffmonoxid	27
3.2.4	DNA-Extraktion aus Organen und Zellkulturen	27
3.2.5	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	27
3.2.6	<i>In vitro</i> Stimulation von Milzzellen	28
3.2.7	Durchflusszytometrie	28
3.2.7.1	Durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen	29
3.2.7.2	Durchflusszytometrische Analyse von Blutzellen	30
3.2.7.3	Durchflusszytometrische Analyse von Gehirnzellen	30
3.2.8	Immunhistochemie	30
3.3	Tierexperimentelle Methoden	31
3.3.1	Infektion von Mäusen mit <i>R. typhi</i>	31
3.3.2	Beurteilung des Gesundheitszustands	31
3.3.3	Blutentnahme	32
3.3.4	Transfer von T-Zellen	32
3.3.5	Injektion von Antikörpern	32
3.3.6	Ethik	33
3.4	Statistik	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Die Bedeutung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen für den Schutz von C57BL/6-Mäusen gegenüber <i>R. typhi</i>	34
4.1.1	C57BL/6-Mäuse generieren im Verlauf einer <i>R. typhi</i> -Infektion eine lang- anhaltende CD4 ⁺ T _H 1- und zytotoxische CD8 ⁺ T-Zell-Antwort	34
4.1.2	Sowohl CD8 ⁺ als auch CD4 ⁺ T-Zellen schützen Mäuse auf C57BL/6-Hin- tergrund vor einer <i>R. typhi</i> -bedingten Erkrankung	40
4.1.3	CD4 ⁺ T-Zellen eliminieren <i>R. typhi</i> weniger effizient	45
4.1.4	C57BL/6 RAG1 ^{-/-} -Mäuse weisen nach CD4 ⁺ T-Zelltransfer erhöhte IFN γ - und TNF α -Konzentrationen im Serum auf	47

Inhaltsverzeichnis

4.1.5	CD4 ⁺ T Zellen steigern die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen und Mikroglia im ZNS von <i>R. typhi</i> -infizierten C57BL/6 RAG1 ^{-/-} -Mäusen	48
4.1.6	Immune CD4 ⁺ T-Zellen fördern die Eliminierung von <i>R. typhi</i> in Makrophagen	55
4.2	Bedeutung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen für den Schutz von BALB/c-Mäusen gegenüber <i>R. typhi</i>	57
4.2.1	BALB/c-Mäuse generieren im Verlauf einer <i>R. typhi</i> -Infektion eine langanhaltende CD4 ⁺ T _H 1- und zytotoxische CD8 ⁺ T-Zell-Antwort	57
4.2.2	BALB/c RAG2 ^{-/-} -Mäuse zeigen nach <i>R. typhi</i> -Infektion die gleichen Symptome wie CB17 SCID-Mäuse	62
4.2.3	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen schützen CB17 SCID-Mäuse vor dem letalen Verlauf einer <i>R. typhi</i> -Infektion	65
4.2.4	CD4 ⁺ T-Zellen eliminieren <i>R. typhi</i> im Vergleich zu CD8 ⁺ T-Zellen zeitlich verzögert, können die Bakterien jedoch langfristig kontrollieren	69
4.2.5	CB17 SCID-Mäuse weisen nach CD4 ⁺ T-Zelltransfer erhöhte IFN γ -Konzentrationen im Serum auf	71
4.3	Untersuchung der von CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen benötigten Effektormechanismen zum Schutz gegenüber <i>R. typhi</i>	72
4.3.1	BALB/c IFN γ ^{-/-} - und BALB/c Perforin ^{-/-} -Mäuse sind gegenüber <i>R. typhi</i> resistent	72
4.3.2	CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen können CB17 SCID-Mäuse unabhängig von IFN γ schützen	73
4.3.3	Die Perforin-vermittelte Zytotoxizität der CD8 ⁺ T-Zellen ist für den Schutz gegenüber <i>R. typhi</i> nicht notwendig	76
4.3.4	CD4 ⁺ T-Zellen steigern die bakterizide Aktivität von Makrophagen <i>in vitro</i> durch die Freisetzung von TNF α und IFN γ	77
4.3.5	TNF α ist für den Schutz von CB17 SCID-Mäusen durch CD4 ⁺ IFN γ ^{-/-} -T-Zellen nicht erforderlich	80
4.3.6	IFN γ -defiziente CD4 ⁺ T-Zellen differenzieren in der <i>R. typhi</i> -Infektion zu T _H 17-Zellen, die IL-17, IL-22 und TNF α produzieren	82
4.3.7	CD4 ⁺ IFN γ ^{-/-} -T-Zellen schützen CB17 SCID-Mäuse auch in Abwesenheit von IL-17	83
5	Diskussion	86
5.1	Adaptive Immunmechanismen sind für die Abwehr von Rickettsien-Infektionen essenziell	86
5.2	CD8 ⁺ T-Zellen vermitteln einen effektiven und langanhaltenden Schutz gegenüber <i>R. typhi</i>	87
5.3	CD4 ⁺ T-Zellen vermitteln ebenfalls Schutz gegenüber <i>R. typhi</i>	91

Inhaltsverzeichnis

5.4 Funktionelle Voraussetzungen für den Schutz durch CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen .	94
5.4.1 CD8 ⁺ T-Zellen schützen unabhängig ihrer Perforin-vermittelten Zytotoxizität	94
5.4.2 Sowohl CD4 ⁺ T _H 1- als auch CD4 ⁺ T _H 17-Zellen wirken protektiv gegenüber <i>R. typhi</i>	96
5.5 Ausblick	102

Publikationen

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
BV	<i>Brilliant violet</i>
BZR	B-Zellrezeptor
C.	<i>Chlamydia</i>
CCL	<i>Chemokine ligand</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
E.	<i>Eimeria</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FCS	<i>Forward scatter</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IBA1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's modified dulbecco's medium</i>
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IVC	<i>Individual ventilated cages</i>
KLRG1	<i>Killer cell lectin-like receptor subfamily G1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
n.i.	Nicht infiziert

Inhaltsverzeichnis

NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
O.	<i>Orientia</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll</i>
PFA	Paraformaldehyd
PK	Proteinkinase
PMA	Phorbolmyristat
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
R.	<i>Rickettsia</i>
RAG	<i>Recombination activating gene</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s.c.	<i>Subcutaneus</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
T.	<i>Trypanosoma</i>
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TZR	T-Zellrezeptor
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

1.1	Kladogramm der Gattung <i>Rickettsia</i>	2
1.2	Übertragungszyklus von <i>R. typhi</i>	3
4.1	Prozentualer Anteil an CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz von C57BL/6-Mäusen im Verlauf der Infektion mit <i>R. typhi</i>	35
4.2	Nachweis Antigen-erfahrener CD8 ⁺ T-Zellen im Verlauf der <i>R. typhi</i> -Infektion in C57BL/6-Mäusen	36
4.3	Eine <i>R. typhi</i> -Infektion führt bei C57BL/6-Mäusen zur Induktion einer zytotoxischen CD8 ⁺ T-Zellantwort	37
4.4	Expression von CD11a auf CD4 ⁺ T-Zellen im Verlauf der <i>R. typhi</i> -Infektion in C57BL/6-Mäusen	38
4.5	Im Verlauf einer <i>R. typhi</i> -Infektion generieren C57BL/6-Mäuse eine CD4 ⁺ T _H 1-Antwort	39
4.6	Sowohl CD8 ⁺ als auch CD4 ⁺ T-Zellen vermitteln Schutz vor <i>R. typhi</i> -bedingter Erkrankung	41
4.7	Adoptiver T-Zelltransfer in <i>R. typhi</i> -infizierte C57BL/6 RAG1 ^{-/-} -Mäuse	42
4.8	Sowohl CD8 ⁺ als auch CD4 ⁺ T-Zellen schützen C57BL/6 RAG1 ^{-/-} -Mäuse vor neurologischer Erkrankung nach <i>R. typhi</i> -Infektion	43
4.9	CD4 ⁺ T-Zellen schützen C57BL/6 RAG1 ^{-/-} -Mäuse im Vergleich zu CD8 ⁺ T-Zellen weniger gut, wenn sie zu einem späten Zeitpunkt der <i>R. typhi</i> -Infektion transferiert werden	44
4.10	Im Vergleich zu CD8 ⁺ T-Zellen eliminieren CD4 ⁺ T-Zellen <i>R. typhi</i> weniger effizient	46
4.11	Im Serum <i>R. typhi</i> -infizierter C57BL/6 RAG1 ^{-/-} -Mäuse lässt sich nach Transfer von CD4 ⁺ T-Zellen ein T _H 1-Zytokin-Profil nachweisen	48
4.12	Nach T-Zelltransfer gelangen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in das Gehirn <i>R. typhi</i> -infizierter C57BL/6 RAG1 ^{-/-} -Mäuse	49
4.13	CD4 ⁺ T-Zellen induzieren im Gehirn <i>R. typhi</i> -infizierter C57BL/6 RAG1 ^{-/-} -Mäuse die Expression von iNOS in Makrophagen und Mikroglia	52
4.14	Immunhistochemischer Nachweis iNOS-exprimierender Zellen im Gehirn <i>R. typhi</i> -infizierter C57BL/6 RAG1 ^{-/-} -Mäuse nach T-Zelltransfer	53

Abbildungsverzeichnis

4.15 Immunhistochemische Färbung von T-Zellen, Makrophagen und Mikroglia sowie iNOS im Gehirn <i>R. typhi</i> -infizierter C57BL/6 RAG1 ^{-/-} -Mäuse nach T-Zelltransfer	54
4.16 Immune CD4 ⁺ T-Zellen fördern die Eliminierung von <i>R. typhi</i> in Knochenmarkmakrophagen <i>in vitro</i>	56
4.17 Prozentualer Anteil an CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz von BALB/c-Mäusen im Verlauf der <i>R. typhi</i> -Infektion	57
4.18 Nachweis Antigen-erfahrener CD8 ⁺ T-Zellen im Verlauf der <i>R. typhi</i> -Infektion in BALB/c-Mäusen	58
4.19 Im Verlauf der <i>R. typhi</i> -Infektion wird in BALB/c-Mäusen eine zytotoxische CD8 ⁺ T-Zellantwort induziert	60
4.20 Expression von CD11a auf CD4 ⁺ T-Zellen im Verlauf der <i>R. typhi</i> -Infektion in BALB/c-Mäusen	61
4.21 BALB/c-Mäuse induzieren im Verlauf einer <i>R. typhi</i> -Infektion eine langanhaltende CD4 ⁺ T _H 1-Antwort	62
4.22 BALB/c RAG2 ^{-/-} -Mäuse zeigen nach <i>R. typhi</i> -Infektion das gleiche Krankheitsbild wie CB17 SCID-Mäuse	64
4.23 Schematische Darstellung des adoptiven Transfers von T-Zellen in CB17 SCID-Mäuse	65
4.24 CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen schützen <i>R. typhi</i> -infizierte CB17 SCID-Mäuse vor einem letalen Krankheitsverlauf	67
4.25 Der T-Zell-vermittelte Schutz von CB17 SCID-Mäusen ist unabhängig vom Transferzeitpunkt vor der Infektion.	68
4.26 CD8 ⁺ T-Zellen eliminieren <i>R. typhi</i> effizienter als CD4 ⁺ T-Zellen	70
4.27 Serum-Zytokin-Profil von CB17 SCID-Mäusen nach T-Zelltransfer	71
4.28 Eine <i>R. typhi</i> -Infektion verläuft bei BALB/c IFN γ ^{-/-} - und BALB/c Perforin ^{-/-} -Mäusen asymptomatisch	73
4.29 IFN γ ist für den CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-vermittelten Schutz <i>R. typhi</i> -infizierter CB17 SCID-Mäuse nicht essenziell	74
4.30 CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen können <i>R. typhi</i> unabhängig von IFN γ kontrollieren	75
4.31 CD8 ⁺ T-Zellen schützen <i>R. typhi</i> -infizierte CB17 SCID-Mäuse unabhängig von Perforin	76
4.32 CD8 ⁺ T-Zellen eliminieren <i>R. typhi</i> in infizierten CB17 SCID-Mäusen unabhängig von Perforin	77
4.33 CD4 ⁺ T-Zellen steigern durch die Freisetzung von TNF α und IFN γ die bakterizide Aktivität von Makrophagen	79
4.34 CD4 ⁺ IFN γ ^{-/-} -T-Zellen schützen CB17 SCID-Mäuse unabhängig von TNF α	81

Abbildungsverzeichnis

4.35	TNF α ist <i>in vivo</i> für die Eliminierung von <i>R. typhi</i> durch CD4 ⁺ IFN γ ^{-/-} -T-Zellen nicht von Bedeutung	82
4.36	CD4 ⁺ IFN γ ^{-/-} -T-Zellen produzieren nach <i>R. typhi</i> -spezifischer Restimulation vermehrt T _H 17-Zytokine	83
4.37	CD4 ⁺ IFN γ ^{-/-} -T-Zellen schützen <i>R. typhi</i> -infizierte CB17 SCID-Mäuse auch in Abwesenheit von IL-17	84
4.38	Für die Eliminierung von <i>R. typhi</i> durch CD4 ⁺ IFN γ ^{-/-} -T-Zellen wird IL-17 nicht benötigt	85
5.1	Hypothetische Wirkmechanismen von CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen in der <i>R. typhi</i> -Infektion	101

Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte	15
2.2	Verbrauchsmaterialien	16
2.3	Chemikalien und Reagenzien	17
2.4	Kits	18
2.5	Lösungen und Puffer	18
2.6	Antikörper	20
2.7	Proteine	21
2.8	Zelllinien	21
2.9	Bakterienstämme	21
2.10	Nukleinsäuren	21
2.11	Mausstämme und -linien	22
2.12	Software	22
3.1	Reaktionsansatz für die <i>PrsA</i> qPCR	28
3.2	Temperaturprofil der <i>PrsA</i> qPCR	28

Zusammenfassung

Rickettsia (R.) typhi ist ein obligat intrazelluläres Bakterium, das beim Menschen das endemische Fleckfieber hervorruft. Die Erkrankung tritt weltweit auf und geht mit Symptomen, wie Fieber, Übelkeit sowie Kopf- und Gliederschmerzen einher. Bei etwa der Hälfte aller Patienten lässt sich ein kleinfleckiger Hautausschlag verzeichnen, der der Krankheit ihren Namen verleiht. Eine Infektion mit *R. typhi* verläuft in der Regel ohne Komplikationen und bei richtiger Diagnose stehen Antibiotika zur Behandlung zur Verfügung. In seltenen Fällen kommt es dennoch zu schweren Erkrankungen, wie Meningoenzephalitis, Pneumonie und Hepatitis, die tödlich enden können. Ein Impfstoff als Präventionsmaßnahme wurde bislang nicht entwickelt. Eine grundlegende Voraussetzung für die Entwicklung eines solchen Impfstoffs ist das Verständnis von Immunmechanismen, die zur Erreger-spezifischen Abwehr beitragen. T-Zellen, insbesondere CD8⁺T-Zellen, wird bei der Immunabwehr von Rickettsiosen eine entscheidende Bedeutung beigemessen. Im Rahmen der Arbeit konnte in verschiedenen Mausmodellen jedoch gezeigt werden, dass CD4⁺T-Zellen ebenso wie CD8⁺T-Zellen gegenüber der Infektion mit *R. typhi* schützen. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺T-Zell-defiziente C57BL/6-Mäuse zeigten nach *R. typhi*-Infektion zu keinem Zeitpunkt Krankheitssymptome und überlebten die Infektion. T- und B-Zell-defiziente C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse entwickeln infolge einer *R. typhi*-Infektion eine hohe Bakterienlast im Gehirn und eine Entzündung des zentralen Nervensystems. Ein adoptiver Transfer immuner CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen in diese Mäuse verhinderte das Auftreten einer neurologischen Erkrankung. Der durch CD4⁺T-Zellen vermittelte Schutz war dabei davon abhängig, zu welchem Infektionszeitpunkt die T-Zellen transferiert wurden. Bei einer bereits fortgeschrittenen *R. typhi*-Infektion, in der sich Bakterien schon im Gehirn nachweisen lassen, schützte ein Transfer immuner CD4⁺T-Zellen nur noch 60 % der C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse. Im Gegensatz dazu konnte durch den Transfer von CD8⁺T-Zellen selbst zu diesem späten Infektionszeitpunkt ein 100 %iger Schutz erzielt werden. CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen migrierten nach Transfer in das zentrale Nervensystem (ZNS) der infizierten Mäuse und führten dort zur Eliminierung von *R. typhi*. Im Vergleich zu CD4⁺T-Zellen waren CD8⁺T-Zellen hierbei schneller und effizienter. Dennoch ließ sich eine erfolgreiche Eliminierung der Bakterien nach dem Transfer von CD4⁺T-Zellen selbst bei Mäusen nachweisen, die der Infektion erlagen. Dies deutet darauf hin, dass ein Fortschreiten der Erkrankung in diesen Mäusen auf immunpathologische Effekte zurückzuführen ist. Im ZNS induzierten CD4⁺T-Zellen die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und damit die Produktion von NO in Mikroglia und infiltrierten Makrophagen. Die Freisetzung von NO

Zusammenfassung

kann zur Eliminierung der Bakterien, aber auch zur Pathologie, beitragen. *In vitro*-Studien belegten, dass immune CD4⁺T-Zellen das Wachstum von *R. typhi* in infizierten Makrophagen inhibieren. Dieser Effekt wurde zumindest zum Teil durch die Sekretion von IFN γ vermittelt. Im Gegensatz zu C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen erliegen T- und B-Zell-defiziente CB17 SCID-Mäuse bereits innerhalb von drei Wochen den Folgen einer *R. typhi*-Infektion. Eine Erkrankung geht bei diesen Mäusen mit einer ausgeprägten Hepatitis und Splenomegalie einher. Ein Transfer naiver CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen konnte CB17 SCID-Mäuse vor dem tödlichen Verlauf einer *R. typhi*-Infektion schützen. CD8⁺T-Zellen waren hierbei in der Lage, unabhängig von IFN γ oder Perforin Schutz zu generieren. Die Perforin-vermittelte Zytotoxizität ist demnach nicht essentiell für die schützende Funktion der CD8⁺T-Zellen. Für eine langanhaltende Kontrolle der Bakterien durch CD8⁺T-Zellen scheint IFN γ sogar wichtiger zu sein. Eine geringe Anzahl persistierender Bakterien war ausschließlich in Mäusen nachweisbar, die IFN γ -defiziente CD8⁺T-Zellen erhalten hatten und fand sich bevorzugt im Gehirn. Immune CD4⁺T-Zellen sekretierten vermehrt IFN γ und TNF α , induzierten *in vitro* die Freisetzung von NO und inhibierten das Bakterienwachstum in *R. typhi*-infizierten Makrophagen. Für die Inhibierung des Bakterienwachstums sind vermutlich sowohl IFN γ als auch TNF α von Bedeutung. Ein Transfer IFN γ -defizienter CD4⁺T-Zellen schützte dennoch 30 - 90 % der *R. typhi*-infizierten CB17 SCID-Mäuse. Immune CD4⁺ IFN γ ^{-/-}T-Zellen inhibierten das Bakterienwachstum *in vitro* und sezernierten neben TNF α charakteristische T_H17-Zytokine (IL-17 und IL-22). Diese Zytokine können neben TNF α zum Schutz gegen bakterielle Erreger beitragen. Entgegen den Erwartungen wurde der Erreger trotz Neutralisierung von TNF α oder IL-17 in CB17 SCID-Mäusen, die CD4⁺ IFN γ ^{-/-}T-Zellen erhalten hatten, genauso gut eliminiert. Im Vergleich zu Kontrollmäusen war die Neutralisation der Zytokine sogar mit einem mildereren Krankheitsverlauf und einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden. TNF α und IL-17 scheinen daher in synergistischer Weise immunpathologische Effekte zu besitzen. Können diese minimiert werden, sind T_H17-Zellen ebenso wie T_H1-Zellen in der Lage, Schutz gegenüber einer Infektion mit *R. typhi* zu vermitteln.

Im Hinblick auf die Entwicklung eines Impfstoffs gegen *R. typhi* lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass die Induktion von CD4⁺T-Effektorzellen ausreichend ist, um einen Schutz zu generieren.

Abstract

R. typhi is an obligate intracellular bacterium that causes endemic typhus in humans. The disease occurs worldwide, but is most prevalent in warmer coastal areas. Common symptoms of endemic typhus include fever, nausea, headache and myalgia. Nearly half of patients develop a characteristic rash. The course of disease is usually mild and antibiotics can be used to treat the infection. In severe cases, however, *R. typhi* may cause fatal complications such as meningoencephalitis, pneumonia and hepatitis. Vaccines against endemic typhus have not yet been developed. A fundamental requirement for vaccine development is the understanding of immune mechanisms that contribute to protection. T cells, especially CD8⁺ T cells, seem to play an important role in protection against rickettsial infections. However, by using different murine infection models the present study demonstrates that CD4⁺ T cells as well as CD8⁺ T cells protect against *R. typhi* infection. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cell-deficient C57BL/6 mice survived the infection without showing symptoms of disease at any point in time. Months after *R. typhi* infection T- and B cell-deficient C57BL/6 RAG1^{-/-} mice show high bacterial load in the brain and develop lethal neurological disorders due to a massive brain inflammation. The adoptive transfer of either immune CD8⁺ or CD4⁺ T cells protected *R. typhi*-infected C57BL/6 RAG1^{-/-} mice from death. While the protective function of CD8⁺ T cells was independent of the time of transfer, CD4⁺ T cells were less protective when applied late in advanced infection. Nevertheless, in this case, immune CD4⁺ T cells still protected approximately 60 % of *R. typhi*-infected C57BL/6 RAG1^{-/-} mice. Adoptively transferred CD8⁺ and CD4⁺ T cells entered the central nervous system (CNS) of infected C57BL/6 RAG1^{-/-} mice and both eradicated *R. typhi*. Although CD8⁺ T cells were faster and more efficient in bacterial elimination, *R. typhi* was not detectable in CD4⁺ T cell recipients anymore. Moreover, bacteria were absent even in CD4⁺ T cell recipients that succumbed to the infection. This indicates that immunopathological effects rather than uncontrolled bacterial growth are responsible for disease progression. CD4⁺ T cells induced the expression of iNOS in infiltrating macrophages as well as in resident microglia in the CNS which can contribute to bacterial killing but also accelerate pathology. *In vitro* studies showed that immune CD4⁺ T cells inhibited bacterial growth in infected macrophages which was at least in part mediated by the release of IFN γ .

In contrast to C57BL/6 RAG1^{-/-} mice, T and B cell-deficient CB17 SCID mice already succumb to *R. typhi* infection within 3 weeks. Upon infection CB17 SCID mice develop splenomegaly, severe hepatitis and fatal systemic inflammation. Adoptive transfer of either naive CD4⁺ or

Abstract

CD8⁺ T cells protected *R. typhi*-infected CB17 SCID mice from death. CD8⁺ T cells lacking IFN γ or Perforin were still protective, demonstrating that Perforin-mediated cytotoxicity is not essential for protection. For long-term control of *R. typhi* IFN γ seems to be even more critical than the cytotoxic activity. A low number of persistent bacteria was only detectable in CB17 SCID mice that received Perforin-deficient CD8⁺ T cells. Here, *R. typhi* was predominantly found in the brain.

Immune CD4⁺ T cells produced increased amounts of IFN γ and TNF α , induced the release of NO in *R. typhi*-infected macrophages and inhibited bacterial growth *in vitro*. Both IFN γ and TNF α are probably important for the elimination of *R. typhi*. However, CD4⁺ T cells that lack IFN γ still protected 30–90% of *R. typhi*-infected CB17 SCID mice. Immune CD4⁺IFN γ ^{-/-} T cells inhibited bacterial growth *in vitro* and produced characteristic T_H17 cytokines (IL-17 and IL-22) in addition to TNF α . Besides TNF α , these cytokines can also contribute to protection against bacterial pathogens. Contrary to the expectations, the bacteria were eliminated despite the neutralisation of either TNF α or IL-17 in CB17 SCID mice that received CD4⁺IFN γ ^{-/-} T cells. Furthermore, neutralisation of TNF α or IL-17 mitigated symptoms of disease and led to enhanced survival compared to control mice. These observations indicate synergistic pathological effects of TNF α and IL-17A and show that T_H17 cells also mediate protection against *R. typhi* if these harmful effects are inhibited.

With regard to vaccine development, the results of this study suggest that the induction of CD4⁺ effector T cells is sufficient to provide protection against *R. typhi*.

1 Einleitung

1.1 Die Familie der Rickettsien (*Rickettsiaceae*)

Rickettsien sind gramnegative Bakterien, deren Vermehrung ausschließlich intrazellulär stattfindet [1]. Sie wurden nach dem amerikanischen Pathologen Howard Taylor Ricketts benannt, der diese im Jahr 1909 erstmalig als Erreger des Rocky-Mountain-Fleckfiebers beschrieb [2]. Das natürliche Reservoir der parasitär lebenden Mikroorganismen sind Arthropoden (Zecken, Flöhe, Läuse und Milben), die gleichzeitig als Vektoren dienen, und Säugetiere [3]. Die Familie *Rickettsiaceae* unterteilt sich in drei Gattungen, *Rickettsia*, *Orientia* und *Occidentia*. Derzeit sind mehr als zwanzig Arten bekannt, die der Gattung *Rickettsia* (*R.*) angehören [4]. Diese lassen sich aufgrund geno- und phänotypischer Eigenschaften in vier verschiedene Gruppen einordnen (Abb. 1.1) [5]. Die artenreichste Gruppe stellt hierbei die Zeckenbissfieber-Gruppe dar. Vertreter dieser Gruppe sind *R. conorii*, Erreger des Mittelmeer-Fleckfiebers, und *R. rickettsii*, Erreger des Rocky-Mountain-Zeckenbissfiebers. *R. typhi* (ursprünglich *R. mooserii*) und *R. prowazekii*, die das endemische und epidemische Fleckfieber hervorrufen, gehören zur Gruppe der Fleckfieber-Rickettsien. Die Übertragung von *R. typhi* erfolgt vornehmlich durch den Rattenfloh, während die Kleiderlaus *R. prowazekii* als Vektor dient. *R. felis*, *R. australis* und *R. akari* besitzen sowohl Merkmale der Zeckenbissfieber- als auch Fleckfieber-Rickettsien. Phylogenetisch sind diese Arten keiner der beiden Gruppen eindeutig zuzuordnen. Die Erreger wurden daher in der sogenannten Übergangsgruppe zusammengefasst. Die avirulenten Arten *R. belli* und *R. canadensis* gelten als Vorfahren der Zeckenbissfieber- und Fleckfieber-Rickettsien und werden aus diesem Grund der Ahnengruppe zugeteilt [6–8]. *Orientia* (*O.*) *tsutsugamushi*, der Erreger des Tsutsugamushi-Fiebers ist alleiniger Vertreter der Gattung *Orientia*. Ursprünglich zählten die durch Milben übertragenen Bakterien ebenfalls zur Gattung *Rickettsia*. Aufgrund molekularbiologischer Unterschiede wurde *O. tsutsugamushi* später in eine eigenständige Gattung eingegliedert [9]. *Occidentia massiliensis* ist phylogenetisch eng verwandt mit *O. tsutsugamushi*. Diese aus Zecken isolierte Art wurde erst kürzlich charakterisiert und einer neuen Gattung innerhalb der Familie *Rickettsiaceae* zugeordnet [10].

1 Einleitung

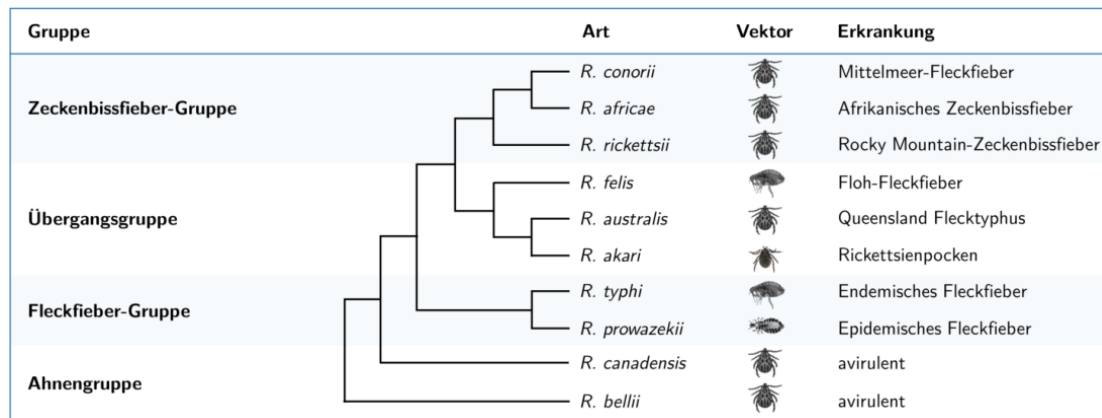


Abbildung 1.1: Kladogramm der Gattung *Rickettsia*. Einteilung der Gattung in verschiedene Gruppen auf der Grundlage geno- und phänotypischer Merkmale (vereinfachte Darstellung nach [11, 12]).

1.2 *Rickettsia typhi*

1.2.1 Lebensweise von *R. typhi*

R. typhi ist ein obligat intrazelluläres Bakterium, dessen Vermehrung von einer eukaryotischen Wirtszelle abhängig ist. Das Hauptreservoir der Bakterien stellt die Hausratte *Rattus rattus* und die Wanderratte *Rattus norvegicus* dar [13, 14]. Darüber hinaus konnten die Rickettsien in anderen Nagetieren, aber auch in Opossums, Hunden und Katzen nachgewiesen werden [15–20]. Eine Übertragung von *R. typhi* auf den Säugetierwirt erfolgt hauptsächlich durch den Rattenfloh *Xenopsylla cheopsis* [13, 14]. Andere Arthropoden, wie der Katzenfloh *Ctenocephalides felis* und der Mausfloh *Leptopsyllia segnis*, können ebenfalls als Überträger fungieren [21–23]. Die Insekten nehmen *R. typhi* bei einer infektiösen Blutmahlzeit auf. Infizierte Flöhe bleiben zeitlebens Träger der Bakterien, wodurch die Vitalität und Reproduktivität der Vektoren jedoch nicht beeinflusst wird [24, 25]. Die Rickettsien werden zudem transovariell an die Folgegeneration weitergegeben [26]. Somit dienen Flöhe neben Ratten ebenfalls als natürliches Reservoir für *R. typhi*. Die Bakterien vermehren sich in Darmepithelzellen des Flohs [24, 27]. Aus dem Darmepithel wird *R. typhi* in das Darmlumen freigesetzt und mit dem Kot ausgeschieden. Bei einer Blutmahlzeit werden die im Kot befindlichen Bakterien auf den Säugetierwirt übertragen und gelangen durch Kratzen an der verwundeten Stelle in die Haut [27, 28]. Im Kot bleiben die Bakterien über Wochen infektiös und werden vermutlich auch aerogen verbreitet [14, 24]. Die Übertragung von *R. typhi* kann zudem über den Speichel infizierter Flöhe erfolgen [27, 28]. Diese Infektionsroute ist allerdings von untergeordneter Bedeutung. Der Übertragungszyklus von *R. typhi* ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Im Säugetierwirt werden die Bakterien durch induzierte Phagozytose in ihre Zielzellen aufgenommen [29, 30]. Die initialen Zielzellen sind bislang nicht bekannt. Da sich *R. typhi* ausschließlich intrazellulär vermehrt, ist davon auszugehen, dass es nach Inokulation zu einem

1 Einleitung

schnellen Eintritt der Bakterien in die Zellen der Haut kommt. Dermale dendritische Zellen und Makrophagen sind hierbei mögliche Ziele der Parasiten. Im weiteren Verlauf infiziert *R. typhi* bevorzugt vaskuläre Endothelzellen [31]. Makrophagen sind ebenfalls wichtige Zielzellen der Rickettsien [32–35]. In den Zellen entweicht *R. typhi* dem Phagosom und vermehrt sich im Zytosol der Zelle. Für die Vermehrung nutzen die Bakterien das Nährstoffangebot der Wirtszelle. Die Lyse der Wirtszelle führt zur Freisetzung und hämatogenen Ausbreitung der Rickettsien, wodurch die Infektion weiterer Zellen erfolgen kann. Im Blut sind die Bakterien zudem wieder für den blutsaugenden Vektor erreichbar [36].

Im Lebenszyklus von *R. typhi* gilt der Mensch als Fehlwirt. Da die Übertragung von *R. typhi* auf den Menschen vornehmlich über den Rattenfloh erfolgt, treten Infektionen vor allem in Gebieten mit hohen Rattenpopulationen und niedrigen Hygienestandards auf [14, 37].

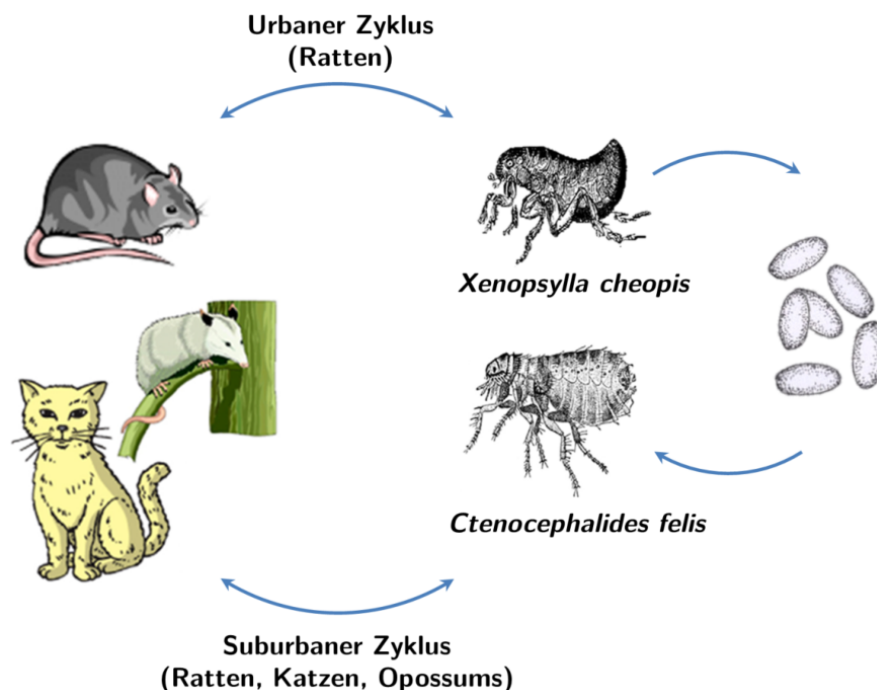


Abbildung 1.2: Übertragungszyklus von *R. typhi*. Das natürliche Reservoir von *R. typhi* sind Ratten. Die Übertragung der Bakterien auf den Säugetierwirt erfolgt hauptsächlich durch den Rattenfloh *Xenopsylla cheopis*. Ein suburbaner Zyklus kann zusätzlich Opossums und Katzen als Wirte sowie den Katzenfloh *Ctenocephalides felis* als Vektor beinhalten. Adulte Flöhe nehmen *R. typhi* bei einer infektiösen Blutmahlzeit auf. Die Bakterien vermehren sich im Darmepithel der Flöhe und werden mit dem Kot ausgeschieden. Bei einer erneuten Blutmahlzeit wird der kontaminierte Kot auf den Säugetierwirt übertragen, und *R. typhi* wird durch Kratzen in die verwundete Stelle eingebracht. Eine Übertragung der Bakterien findet darüber hinaus auch transovariell statt, indem adulte Weibchen die Rickettsien an die Folgegeneration weitergeben (modifiziert nach [38])

1.2.2 Das endemische Fleckfieber - Symptome, Therapie und Epidemiologie

R. typhi ist der Erreger des endemischen Fleckfiebers beim Menschen. Das klinische Bild ähnelt dem des durch *R. prowazekii* ausgelösten epidemischen Fleckfiebers, wenngleich eine Infektion mit *R. typhi* gewöhnlich milder verläuft. Bei einer Erkrankung treten nach einer Inkubationszeit von 7-14 Tagen gewöhnlich grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen auf [21, 39]. Übelkeit und Schüttelfrost sind weitere Symptome, die mit dem endemischen Fleckfieber einhergehen. Bei etwa der Hälfte aller Erkrankten lässt sich im Infektionsverlauf ein kleinleckiger Hautausschlag verzeichnen [40, 41]. Der charakteristische Hautausschlag, der der Krankheit ihren Namen verleiht, ist dabei vorwiegend im Rumpfbereich, aber auch an den Extremitäten lokalisiert. Im Vergleich zu Rickettsienarten wie *R. prowazekii* und *R. rickettsii* ist *R. typhi* weniger pathogen und eine Genesung stellt sich meist innerhalb von 15 Tagen nach Auftreten der ersten Symptome ein. Dennoch kommt es in seltenen Fällen zu schweren *R. typhi*-bedingten Erkrankungen, wovon vor allem ältere und immunsupprimierte Menschen betroffen sind [28, 42, 43]. Folgen einer disseminierten Infektion können zum Beispiel Funktionsstörungen der Lunge [44–46], Milz [47–49], Leber [50, 51], Nieren [52] und des Herzens [53] sein. Des Weiteren wurde von Entzündungen der Hirnhäute [54, 55], lokal auftretenden Lähmungen [56], Hörverlust [57, 58] und Augenkrankheiten [59–61] berichtet. Eine Infektion mit *R. typhi* kann unter Umständen auch tödlich verlaufen [62, 63]. Die Letalitätsrate ist mit unter 5 % im Vergleich zu einer Infektion mit *R. prowazekii* (20 - 30 %) jedoch relativ gering [21, 36, 64]. Endemisches Fleckfieber wird meist indirekt über den Nachweis spezifischer Antikörper im Blut diagnostiziert. Wird die Erkrankung rechtzeitig erkannt, kann sie mit Antibiotika, wie Doxycyclin und Chloramphenicol, behandelt werden [65]. Aufgrund der unspezifischen Symptomatik und des geringen Bekanntheitsgrads wird das endemische Fleckfieber jedoch häufig fehldiagnostiziert [39, 66]. Ein Impfstoff steht derzeit nicht zur Verfügung. Die einzige präventive Maßnahme, die gegenwärtig getroffen werden kann, um das Auftreten *R. typhi*-bedingter Krankheiten zu minimieren, ist die Verwendung von Bettnetzen und der Einsatz von Insektiziden und Rodentiziden zur Bekämpfung der Flöhe und ihrer Wirte in endemischen Gebieten.

Infektionen mit *R. typhi* treten weltweit auf. Endemische Gebiete sind vorwiegend Küstenregionen mit gemäßigttem oder subtropischem Klima [21, 28]. Während der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts kam es zu einer Vielzahl von *R. typhi*-Infektionen in den USA. So wurden allein in den 40er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts tausende Fälle dokumentiert [24]. Durch Schädlingsbekämpfungsprogramme konnte die Anzahl der Neuinfektionen deutlich reduziert werden [24, 67, 68]. Dennoch wurden in den 80er Jahren allein in Texas mehr als 300 Fälle von endemischem Fleckfieber diagnostiziert [69]. Serologische Untersuchungen und Fallbeispiele der letzten 15 Jahre zeigten, das endemische Fleckfieber ist längst kein Relikt der Vergangenheit. Neuinfektionen treten weiterhin in allen Teilen der Welt auf [22, 43, 70–

1 Einleitung

93]. Eine systematische Analyse aktueller Fallstudien ergab, dass vor allem Bewohner ländlicher Regionen vom endemischen Fleckfieber betroffen sind [94]. In diesen Regionen kommen eine Vielzahl von Säugetieren vor, die als Reservoirwirte dienen können. Von einem engen Kontakt zu einem Tier berichteten jedoch weniger als die Hälfte aller Patienten [94]. Die höchste Seroprävalenz von *R. typhi*, die in der gegenwärtigen Literatur beschrieben wird, ließ sich in bergigen Kaffeeanbaugebieten im Zentrum Kolumbiens nachweisen [95]. *R. typhi*-spezifische Antikörper konnten hier in 25,2 % der untersuchten Personen detektiert werden. Innerhalb Europas sind Kreta (165 Fälle, 1993 - 2008) und Zypern (193 Fälle, 2000 - 2008) bekannte Endemiegebiete [96, 97]. Zudem wurde in den letzten Jahren eine Zunahme der Seroprävalenz bei Obdachlosen in Frankreich beobachtet. Waren in den Jahren 2000 bis 2003 nur 0,54 % seropositiv für *R. typhi*, konnten im Zeitraum von 2010 bis 2012 bei 22 % der Untersuchten spezifische Antikörper nachgewiesen werden [98, 99]. Auch wenn die Anzahl an diagnostizierten Infektionen in Deutschland bislang gering ist, wird das endemische Fleckfieber immer häufiger bei Reisenden diagnostiziert, die aus Endemiegebieten zurückkehren [100–102].

1.3 Die Immunantwort gegenüber Rickettsien

Rickettsiosen, wie das endemische Fleckfieber, können mit Antibiotika behandelt werden. Impfstoffe als Präventionsmaßnahme stehen bislang jedoch nicht zur Verfügung. Aufgrund steigender Fallzahlen, dem Risiko der Resistenzentwicklung, und nicht zuletzt weil Rickettsien zu den potentiellen Biowaffen zählen, ist die Entwicklung eines Impfstoffs von großer Bedeutung. Die Impfstoffentwicklung erfordert Kenntnisse über Immunmechanismen, die zum Schutz vor der Erkrankung oder auch zur Pathologie beitragen. Über die Immunmechanismen, die bei der Abwehr von *R. typhi* von Bedeutung sind, ist bislang jedoch nur wenig bekannt. Die meisten immunologischen Erkenntnisse beruhen auf Untersuchungen, die mit Rickettsien der Zeckenbissfieber-Gruppe erfolgten. Diese wurden in erster Linie mithilfe von Mausmodellen erzielt, die im Folgenden näher erläutert werden.

1.3.1 Mausmodelle für die Infektion mit Rickettsien

Geeignete Infektionsmodelle zeichnen sich durch verschiedene Kriterien aus. Die Versuchstiere sind suszeptibel gegenüber dem Erreger und entwickeln für die Erkrankung charakteristische Symptome. Im Modellorganismus findet eine Vermehrung des Erregers statt, und der Infektionsverlauf ist reproduzierbar [103].

Wildtyp-Mäuse: C3H/HeN, BALB/c und C57BL/6

C3H/HeN-Mäuse erfüllen diese Kriterien gegenüber einer Reihe verschiedener Rickettsienarten, darunter *R. conorii* und *R. typhi*. Im Vergleich zu einer Infektion mit *R. typhi* sind

1 Einleitung

C3H/HeN-Mäuse gegenüber *R. conorii* anfälliger. Die Suszeptibilität der Mäuse ist hierbei nicht nur von der Dosis, sondern auch von der Infektionsroute abhängig. Eine letale Infektion kann mit beiden Rickettsienarten lediglich durch eine intravenöse Applikation erzielt werden. Im Verlauf einer *R. conorii*-Infektion entwickeln C3H/HeN-Mäuse eine Meningoenzephalitis, Pneumonie und Hepatitis [104, 105]. Eine Infektion mit *R. typhi* führt bei den Mäusen zu einer Enzephalitis und Pneumonie [106]. Für *R. akari* und *R. parkeri* sind C3H/HeN-Mäuse hingegen nicht empfänglich [107, 108].

C57BL/6 und BALB/c Wildtyp-Mäuse sind gegenüber Infektionen mit den meisten Rickettsien einschließlich *R. typhi* resistent. Die Resistenz ist dabei unabhängig von der Infektionsroute [107, 109–112]. Für Studien mit *R. australis* sind BALB/c-Mäuse jedoch ein etabliertes Infektionsmodell. Bei intravenöser Infektion entwickeln die Mäuse eine ausgeprägte Vasculitis, Pneumonie und Hepatitis [113].

Durch die Verfügbarkeit diverser Knockout-Linien sind BALB/c- und C57BL/6-Mäuse für das Studium protektiver Immunantworten gegenüber Rickettsien dennoch interessant. Insbesondere immundefiziente BALB/c- und C57BL/6-Mäuse, die keine T- und B-Zellen ausbilden können, haben sich als geeignete Modelle für die Infektion mit *R. typhi* herausgestellt [114, 115]. Diese Infektionsmodelle wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet und werden im Folgenden näher beschrieben.

Die C57BL/6 RAG1^{-/-}-Maus

C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse sind aufgrund einer Mutation im rekombinationsaktivierenden Gen 1 (RAG1) nicht in der Lage, funktionelle T- und B-Zellen zu generieren [116]. Den Mäusen stehen daher lediglich die Mechanismen des angeborenen Immunsystems zur Verteidigung zur Verfügung. Eine Infektion mit *R. typhi* verläuft in diesen Mäusen, wie die mit *R. conorii* [104], zuerst ohne erkennbare Symptome [114]. Monate nach der *R. typhi*-Infektion kommt es jedoch zu einer massiven Expansion der Bakterien im Gehirn der Mäuse. Die damit einhergehende Entzündung des Gehirns führt zunächst zu leichten motorischen Auffälligkeiten wie Gleichgewichts- und Koordinationsstörungen. Bei einigen Tieren ist eine monolaterale Trübung der Augenlinse zu beobachten. Im weiteren Verlauf zeigen sich Schlaganfall-ähnliche Symptome und fortschreitende Lähmungserscheinungen, die schließlich zum Tod der Mäuse führen [114]. Im ZNS der infizierten Mäuse lässt sich eine Zunahme und Akkumulation aktivierter Mikroglia sowie ein Verlust von Neuronen detektieren. Gehirn und Rückenmark weisen zudem eine erhöhte Infiltration von Makrophagen aus der Peripherie auf. Diese Zellen beinhalten *R. typhi* und exprimieren iNOS [114]. Der tödliche Ausgang der Infektion ist in diesem Modell unabhängig von der Infektionsroute und wird nach intravenöser wie subkutaner Injektion beobachtet. Eine subkutane Infektion kommt der natürlichen Infektionsroute sehr viel näher und wird daher der intravenösen Applikation vorgezogen.

Eine ZNS-Beteiligung bei einer Infektion mit *R. typhi* wird auch beim Menschen beobach-

1 Einleitung

tet. Bakterielle ZNS-Erkrankungen sind in Laos sogar relativ häufig auf *R. typhi*-Infektionen zurückzuführen [117]. Meningitis und Meningoenzephalitis sind hierbei die häufigsten neurologischen Manifestationen. Diese treten bei etwa 2 - 5 % der am endemischen Fleckfieber erkrankten Patienten auf [118]. In seltenen Fällen zeigen sich nach *R. typhi*-Infektion Funktionsstörungen von Hirnnerven, Ataxie und halbseitige unvollständige Lähmungen [118, 119]. Ein erhöhter intrakranieller Druck führt bei einigen Patienten zu einem Papillenödem, das zur Beeinträchtigung des Sehvermögens, Kopfschmerzen und Erbrechen führen kann [60, 120].

Eine *R. typhi*-Infektion führt bei C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen zu ähnlichen Symptomen wie die neurologische Manifestation der Erkrankung beim Menschen. Die Mäuse stellen daher ein geeignetes Modell für die Erforschung des endemischen Fleckfiebers dar.

Die CB17 SCID-Maus

CB17 SCID-Mäuse, deren genetischer Hintergrund der BALB/c-Mausstamm ist, tragen Mutationen in einem Gen, das für die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein-kinase (DNA-PKcs) kodiert. Dieses Protein ist unter anderem an der Rekombination des Antigenrezeptors von B- und T-Zellen beteiligt. Aufgrund der Dysfunktion der DNA-PKcs sind CB17 SCID-Mäuse nicht in der Lage, funktionelle T- und B-Zellen auszubilden [121, 122]. Die Mäuse gleichen aus immunologischer Sicht demnach C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen. Eine Infektion mit *R. conorii* äußert sich bei CB17 SCID-Mäusen mit einer leichten Hepatitis und nimmt einen milden Verlauf [104]. Im Gegensatz dazu endet eine *R. typhi*-Infektion bei diesen Mäusen innerhalb von drei Wochen tödlich [115]. Das Krankheitsbild *R. typhi*-infizierter CB17 SCID-Mäuse unterscheidet sich sehr von dem infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse. Eine hohe Erregerlast kann bei CB17 SCID-Mäusen in allen Organen, insbesondere in der Milz, detektiert werden [115]. Obwohl die Bakterien auch im Gehirn nachweisbar sind, zeigen CB17 SCID-Mäuse keine neurologischen Auffälligkeiten. Die Erkrankung äußert sich bei diesen Mäusen durch eine vergrößerte Milz, einen schweren Leberschaden sowie eine starke systemische Inflammation, die letztlich zum Tod der Mäuse führt. Ursache für die Splenomegalie ist eine massive Akkumulation von Makrophagen und Neutrophilen [115]. Beide Zellpopulationen akkumulieren ebenfalls in der Leber, wenngleich der Leberschaden allein auf die Neutrophilen zurückzuführen ist [115].

Milz- und Leberpathologie zählen auch zum klinischen Erscheinungsbild des endemischen Fleckfiebers beim Menschen. Eine Vergrößerung der Milz infolge einer *R. typhi*-Infektion wird bei etwa 17 % der dokumentierten Fälle beobachtet [94]. Bei einem Drittel aller Patienten lässt sich ein signifikanter Anstieg der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)-Konzentration im Blut feststellen [94]. Eine erhöhte Freisetzung dieses Enzyms deutet auf eine Erkrankung der Leber hin.

CB17 SCID-Mäuse entwickeln nach einer Infektion mit *R. typhi* Symptome, die dem Krank-

heitsbild beim Menschen ähneln. Für das Studium der *R. typhi*-Infektion sind diese Mäuse daher ein weiteres gut geeignetes Modell.

1.3.2 Die angeborene Immunantwort gegenüber Rickettsien

Die Hauptzielzellen der meisten Rickettsienarten stellen Endothelzellen dar, die die Innenwand der Blutgefäße auskleiden [106]. Endothelzellen werden zwar nicht dem Immunsystem zugeordnet, dennoch setzen sie nach Eintritt der Bakterien eine Reihe von Immunmechanismen in Gang, die zur Pathogenabwehr beitragen. So exprimieren aktivierte Endothelzellen Zytokine (z. B. IL-1 β , IL-15, TNF α), Chemokine (z. B. CXCL8, CCL2), Enzyme (z. B. iNOS) und Adhäsionsmoleküle (z. B. VCAM-1, ICAM-1), die u. a. für die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten verantwortlich sind [123–125].

Phagozytische Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Neutrophile, Makrophagen und Dendritische Zellen, gehören zu den ersten Zellen, die den Ort der Infektion erreichen. Ihre Aufgabe besteht darin, in den Körper eingedrungene Pathogene aufzunehmen und zu eliminieren. Pathogene können vom angeborenen Immunsystem anhand charakteristischer molekularer Merkmale erkannt werden. Diese Struktur motive werden Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) genannt [126]. Zu den PAMPs gehören z. B. Zellwandbestandteile von Bakterien wie Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykan und virale Nukleinsäuren. Rezeptorproteine, die eine Erkennung der mikrobiellen Strukturen ermöglichen, werden als Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *pattern recognition receptors*) bezeichnet [126]. Zu den bekanntesten PRRs zählen die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs, *toll-like receptors*) [127]. Einer der Haupttranskriptionsfaktoren, der über TLRs aktiviert wird, ist NF- κ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*). NF- κ B induziert die Expression von Genen, die für inflammatorische Zytokine (z. B. IL-6, IL-12, TNF α) und kostimulatorische Moleküle (z. B. CD80, CD86) kodieren [128]. Darüber hinaus stimuliert NF- κ B die Bildung von iNOS und folglich die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) [129, 130]. Die Synthese von antimikrobiellem NO ist für die Beseitigung aufgenommener Erreger von großer Bedeutung. Makrophagen kommt hierbei eine besondere Rolle zu. Neben NO produzieren die Phagozyten mikrobizide Enzyme, wie Lysozyme, Kollagenasen und Elastasen, die ebenfalls zur Erregereliminierung beitragen [131]. Ohne Hilfe sind Makrophagen jedoch nicht in der Lage, Rickettsien zu eliminieren. Vielmehr zählen die Phagozyten zu den Zielzellen der Bakterien. Einige Rickettsienarten, wie *R. akari* infizieren sogar vorwiegend Makrophagen [33]. Gleiches wird auch für *O. tsutsugamushi*, *R. conorii* und *R. typhi* diskutiert. *O. tsutsugamushi* lässt sich im Gewebe infizierter BALB/c-Mäuse hauptsächlich in Makrophagen nachweisen [132]. In der Leber infizierter Mäuse wird *O. tsutsugamushi*, aber auch *R. conorii*, vor allem in hepatischen Makrophagen, vermutlich Kupffer-Zellen, detektiert [105, 133]. *R. typhi* kann bei CB17 SCID- und C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen mit einer fortgeschrittenen Infektion nahezu ausschließlich in Makrophagen und

1 Einleitung

nicht in Endothelzellen nachgewiesen werden [114, 115].

Durch eine Infektion mit Rickettsien werden Makrophagen zumindest teilweise aktiviert. *R. australis* induziert in Knochenmarkmakrophagen von BALB/c-Mäusen die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 sowie die Aktivierung des Inflammasoms [134]. Dieser zytosolische Multiproteinkomplex ist an der Aktivierung inflammatorischer Caspasen und Entzündungsmediatoren beteiligt [135]. Zudem lässt sich im Serum *R. australis*-infizierter BALB/c-Mäuse eine erhöhte Konzentration von IL-1 β , IL-6 und TNF α detektieren [113] - Zytokine, die vor allem von Makrophagen produziert werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *R. akari* in der Makrophagenzelllinie P338D1 und in Peritonealmakrophagen von C3H/HeN-Mäusen die Aktivierung von NF- κ B sowie die Expression von IL-1 β , IL-6 und TNF α induziert [35]. Die Aktivierung der Phagozyten erfolgt vermutlich über TLR-vermittelte Signalwege. *R. akari* stimuliert *in vitro* TLR2 und TLR4 und führt so zur Phagozytenaktivierung [136]. Der TLR4-vermittelte Signalweg scheint auch für die Eliminierung von *R. conorii* wichtig zu sein. So nimmt die Infektion TLR4-defizienter C3H/HeJ-Mäuse mit einer gewöhnlich subletalen Dosis *R. conorii* einen tödlichen Verlauf [137]. TLR4-defiziente Mäuse zeigen ebenfalls eine erhöhte Suszeptibilität für *R. parkeri* [108].

Makrophagen zählen zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), die eine wichtige Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort darstellen [138]. APZ nehmen Erreger und Substanzen aus dem extrazellulären Raum auf und bauen diese im Endosom ab. Die entstandenen Peptidfragmente werden an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden und an die Zelloberfläche transportiert. Dort können die präsentierten Antigene von CD4⁺T-Zellen des adaptiven Immunsystems erkannt werden. Von APZ erhalten T-Zellen zudem kostimulatorische Signale, die für die vollständige Aktivierung der Zellen benötigt werden. Darüber hinaus steuern aktivierte APZ durch die Freisetzung von Zytokinen die Differenzierung der T-Zellen [126]. Für die Aktivierung von APZ und folglich für die Initiierung der adaptiven Immunantwort, die zur Eliminierung der Bakterien benötigt wird, scheint TLR4 bei Infektionen mit Rickettsien der Zeckenbissfieber- und Übergangsgruppe bedeutsam zu sein. Ob TLR-vermittelte Signalwege bei der Infektion mit *R. typhi* eine Rolle spielen, ist bislang nicht geklärt. Zwar wurde beschrieben, dass *R. typhi* die Aktivierung von NF- κ B und die Expression von IL-1 β , IL-6 und TNF α in Peritonealmakrophagen von C3H/HeN-Mäusen induziert [35], jedoch ist eine Infektion von Knochenmarkmakrophagen aus BALB/c- oder C57BL/6-Mäusen *in vitro* nicht mit der Freisetzung von Zytokinen oder NO verbunden [139, 140]. *In vivo* exprimieren Makrophagen und Neutrophile *R. typhi*-infizierter CB17 SCID- und C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse iNOS [115]. Eine Korrelation zwischen der iNOS-Expression und der Aufnahme der Bakterien ließ sich aber nicht feststellen. Es ist daher fraglich, ob *R. typhi* Makrophagen tatsächlich direkt über TLRs aktiviert. Vielmehr wird angenommen, dass die Aktivierung der Zellen *in vivo* indirekt über die Freisetzung stimulierender Faktoren durch geschädigte Zellen oder anderen Immunzellen, wie Natürliche Killerzellen

1 Einleitung

(NK-Zellen), erfolgt [115].

Die Bildung reaktiver Stickstoffspezies wie NO führt in Makrophagen zur Inhibierung des Rickettsienwachstums [141] und ist für die Abwehr der Bakterien *in vivo* von großer Bedeutung. So weisen *R. typhi*-infizierte C3H/HeN-Mäuse mit gehemmter NO-Synthese eine deutlich höhere Erregerlast auf [142]. Die Freisetzung von NO kann in Makrophagen und anderen Zellen durch Zytokine wie IFN γ und TNF α induziert werden [143–146]. Diese Zytokine werden u. a. von NK-Zellen sekretiert, die ebenfalls zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören. NK-Zellen sind durch ihre zytotoxische Aktivität darüber hinaus auch in der Lage, infizierte Zellen direkt abzutöten. Die Differenzierung zwischen gesunden und infizierten Zellen erfolgt hierbei durch aktivatorische und inhibitorische Oberflächenrezeptoren der NK-Zellen [126]. Nach Aktivierung setzen NK-Zellen zytotoxische Granula frei, die Perforin und Granzyme enthalten. Die Hauptfunktion von Perforin ist das Einschleusen der Granzyme in das Zytoplasma einer Zielzelle [147]. Wie genau dieser Prozess erfolgt, ist bislang ungeklärt. In der Zielzelle induzieren Granzyme, u. a. durch die Spaltung und Aktivierung von Caspasen, den programmierten Zelltod [148].

NK-Zellen scheinen bei der frühen Immunabwehr von Rickettsien relevant zu sein. Eine gesteigerte NK-Zellaktivität und eine erhöhte IFN γ -Freisetzung ließ sich bei *R. conorii*-infizierten C3H/HeN-Mäusen zwischen dem 2. und 6. Tag und bei *R. typhi*-infizierten C57BL/6-Mäusen am 2. Tag nach Infektion nachweisen [112]. Zudem führte die Depletion von NK-Zellen bei diesen Mäusen zu einer reduzierten IFN γ -Synthese und einer erhöhten Suszeptibilität [112]. Vergleichbare Beobachtungen wurden ebenfalls bei *R. conorii*-infizierten C57BL/6 RAG2^{-/-} γ c^{-/-}-Mäusen, denen neben T- und B-Zellen auch NK-Zellen fehlen, und NK-Zell-depletierten CB17 SCID-Mäusen gemacht. Diese Mäuse wiesen eine erhöhte Erregerlast und Suszeptibilität gegenüber *R. conorii* auf [104]. Darüber hinaus war eine *R. conorii*-Infektion bei C57BL/6 RAG2^{-/-} γ c^{-/-}-Mäusen gegenüber NK-Zell-kompetenten C57BL/6 RAG2^{-/-}-Mäusen mit einer verstärkten Leberpathologie und einer reduzierten IFN γ -Synthese verbunden [104]. NK-Zellen können sowohl durch die Freisetzung ihrer Granula als auch durch die Sekretion von IFN γ zur Rickettsienabwehr beitragen. Die Produktion von IFN γ scheint hierbei jedoch von größerer Bedeutung zu sein, da *R. conorii*-infizierte C57BL/6 RAG2^{-/-} Perforin^{-/-}-Mäuse ohne zytotoxische NK-Zellaktivität, im Vergleich zu C57BL/6 RAG2^{-/-}-Mäusen, erhöhte Mengen IFN γ freisetzten und eine geringere Bakterienlast aufwiesen [104]. Trotz reduzierter Erregerlast zeigten C57BL/6 RAG2^{-/-} Perforin^{-/-}-Mäuse nach *R. conorii*-Infektion eine ausgeprägte Leberpathologie [104]. Dies deutet auf immunpathologische Effekte der NK-Zellen hin. Welche Rolle NK-Zellen bei der Abwehr von *R. typhi* spielen, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Studien mit *R. typhi*-infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen haben gezeigt, dass diese am 3. Tag nach Infektion verstärkt IFN γ produzieren, eine Depletion von NK-Zellen jedoch keine Auswirkungen auf die IFN γ -Konzentration im Serum und den Infektionsverlauf hat [114]. In *R. typhi*-infizierten CB17 SCID-Mäusen produzieren sowohl Makrophagen als auch

1 Einleitung

NK-Zellen vermehrt $\text{IFN}\gamma$ [115]. Trotz der Gegenwart aktivierter NK-Zellen und einer erhöhten $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung sind diese Mäuse jedoch nicht in der Lage, *R. typhi* abzuwehren.

1.3.3 Die adaptive Immunantwort gegenüber Rickettsien

Das adaptive Immunsystem ist für die Abwehr von Rickettsien von essentieller Bedeutung. Dies belegen Studien mit immundefizienten Mäusen, die im Vergleich zu immunkompetenten Mäusen eine deutlich erhöhte Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit Rickettsien aufweisen [114, 115, 149]. Die adaptive Immunantwort wird durch B- und T-Zellen sowie den von diesen Zellen freigesetzten löslichen Mediatoren vermittelt. B- und T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche spezifische B- bzw. T-Zellrezeptoren (BZR, TZR), die der Erkennung von Strukturen dienen, die als Antigene bezeichnet werden. Nach Antigenerkennung sekretieren aktivierte B-Zellen Antikörper derselben Spezifität ihres Membran-gebundenen BZR. Die Bindung der Antikörper an Pathogene kann deren Infektiosität neutralisieren und diese gleichzeitig für die Eliminierung durch Phagozyten oder Effektormechanismen wie dem Komplementsystem markieren.

Die Bedeutung der B-Zellantwort für die Abwehr von Rickettsien ist bislang nicht eindeutig geklärt. Eine passive Immunisierung von C3H/HeN SCID-Mäusen mit polyklonalem Immunserum aus C3H/HeN-Mäusen oder monoklonalen Antikörpern gegen die Oberflächenproteine OmpA oder OmpB führte zum Schutz der Mäuse vor einer letalen Dosis *R. conorii* [149]. Die Antikörper-sekretierenden B-Zellen tragen demnach zur Beseitigung von *R. conorii* bei. In Studien mit *R. akari* wurde hingegen gezeigt, dass ein passiver Transfer von Seren immunisierter BALB/c^{nu/+}-Mäuse die Überlebenswahrscheinlichkeit T-Zell-defizienter athymischer BALB/c^{nu/nu}-Mäuse nicht erhöht [150]. Ein Transfer von Milzzellen aus immunkompetenten Mäusen wirkte hingegen schützend. Dies lässt auf die Notwendigkeit eines T-Zell-abhängigen Schritts bei der Bekämpfung der Rickettsien schließen.

Bei T-Zellen erfolgt die Erkennung von Antigenen über den TZR. Im Gegensatz zum BZR, der extrazelluläre Antigene direkt binden kann, erkennt der TZR lediglich kurze Peptidfragmente, die im Komplex mit MHC-Molekülen auf der Oberfläche körpereigener Zellen präsentiert werden. T-Zellen lassen sich anhand von Oberflächenmolekülen in zwei Subklassen unterteilen, CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen. CD4⁺T-Zellen fungieren in erster Linie als Helferzellen, die durch die Freisetzung von Zytokinen die Aktivierung anderer Immunzellen fördern. T-Helferzellen (T_H) erkennen über ihren TZR Antigene, die ihnen auf der Oberfläche professioneller APZ, wie Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen, in einem Komplex mit MHC-Klasse-II-Molekülen, präsentiert werden. Nach Aktivierung differenzieren CD4⁺T-Zellen in verschiedene Typen von Effektorzellen. Welcher Typ von CD4⁺T-Effektorzellen als Reaktion auf eine Infektion gebildet wird, hängt von dem lokalen Zytokinmilieu ab [151]. Bei der Abwehr intrazellulärer Erreger sind insbesondere T_H1-Zellen relevant. Diese produzieren $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ und fördern die Eliminierung intrazellulärer Pathogene u. a. durch

1 Einleitung

die Aktivierung von Makrophagen [152]. Bei der Makrophagenaktivierung können $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ miteinander kooperieren und die Expression von iNOS und somit die NO-Synthese induzieren [146]. $\text{IFN}\gamma$ stimuliert darüber hinaus die Produktion von NO in Endothelzellen [153]. $\text{T}_\text{H}17$ -Zellen stellen einen weiteren Typ von T-Helferzellen dar, der zur Abwehr intrazellulärer Erreger beitragen kann. Diese Zellen zeichnen sich durch die Produktion von IL-17, IL-22 und IL-21 aus [154]. IL-17 fördert die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, die neutrophile Granulozyten zum Infektionsherd rekrutieren [155, 156]. Diese können vor Ort zur Eliminierung des Erregers beitragen. Des Weiteren steigert IL-17 die Produktion von NO sowie die Freisetzung antimikrobieller Defensine in Zellen des angeborenen Immunsystems [157, 158]. IL-22 fördert ebenfalls die Expression von Defensinen, wirkt dabei jedoch auf Nicht-Immunzellen [159, 160]. CD4^+ T-Zellen, die zu $\text{T}_\text{H}2$ -Zellen differenzieren, dienen vornehmlich der Abwehr extrazellulärer Parasiten, wie z. B. Würmer. $\text{T}_\text{H}2$ -Zellen sekretieren Zytokine, die u. a. die Produktion von IgE-Antikörpern in B-Zellen stimuliert [161]. Parasitenspezifisches IgE wird von Mastzellen gebunden und führt zur Degranulation. Die dabei freigesetzten Mediatoren induzieren eine lokale Entzündung, die zur Eliminierung der Parasiten beiträgt [162].

Bei der Infektion von C3H/HeN-Mäusen mit *R. conorii* produzierten CD4^+ T-Zellen vermehrt $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ und wiesen somit einen $\text{T}_\text{H}1$ -Phänotyp auf [163]. Ein Transfer immuner CD4^+ T-Zellen schützte C3H/HeN-Mäuse gegenüber *R. conorii* und die Mäuse überlebten die Infektion mit einer gewöhnlich tödlichen Dosis [163]. Die u. a. von CD4^+ T-Zellen sekretierten Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ sind bei der Abwehr von *R. conorii* von großer Bedeutung. Eine Neutralisation von $\text{IFN}\gamma$ oder $\text{TNF}\alpha$ war bei *R. conorii*-infizierten C3H/HeN-Mäusen mit einem unkontrollierten Bakterienwachstum und einer verminderten Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert [142]. Swiss Webster Mäuse, die gewöhnlich resistent gegenüber einer Infektion mit *R. conorii* sind, entwickelten nach Neutralisation von $\text{IFN}\gamma$ Symptome und etwa die Hälfte der Mäuse verstarb infolge der Infektion [164]. Ein $\text{IFN}\gamma$ -Defizit führte bei *R. typhi*-infizierten C3H/HeN-Mäusen zur Zunahme der Erregerlast und der Sterblichkeit bei einer normalerweise subletalen Dosis [106]. Darüber hinaus war die tödliche Dosis *R. australis* für C57BL/6 $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu Wildtyp C57BL/6-Mäusen 100-mal geringer [165]. Eine Depletion von CD4^+ T-Zellen hatte bei *R. conorii*-infizierten C3H/HeN-Mäusen jedoch keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf [163]. Für die Vermittlung von Schutz sind CD4^+ T-Zellen demzufolge nicht zwingend erforderlich.

Bei der Abwehr intrazellulärer Erreger wird CD8^+ T-Zellen eine besondere Rolle beigemessen. Die Hauptfunktion von CD8^+ T-Zellen besteht dabei in der Erkennung und Eliminierung infizierter Zellen. CD8^+ T-Zellen erkennen Antigene in einem Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen, die von nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden [126]. MHCI-Moleküle präsentieren Fragmente zytosolischer Proteine, die im Proteasom der Zelle degradiert wurden. Neben körpereigenen werden auf infizierten Zellen somit auch fremde Peptide prä-

1 Einleitung

sentiert, die von CD8⁺T-Zellen passender Spezifität erkannt werden können [126]. Aktivierte CD8⁺T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen. Diese sind, ähnlich wie NK-Zellen, in der Lage Zielzellen durch die Ausschüttung von Perforin und Granzymen zu eliminieren [166]. Für die gezielte Abtötung von Zellen steht CD8⁺T-Zellen neben dem Granula-vermittelten Weg ein zweiter Mechanismus zur Verfügung. Zytotoxische T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den sogenannten Fas-Liganden. Dieser bindet auf Zielzellen an den Zelloberflächenrezeptor Fas und löst so eine Signalkaskade aus, die zur Apoptose führt [167]. Die Hauptfunktion des Rezeptor-vermittelten Signalwegs ist die Eliminierung selbstreaktiver lymphoider Zellen. Bei der Beseitigung infizierter Zellen wird diesem Weg eine geringere Bedeutung beigemessen [168]. Neben ihrer zytotoxischen Funktion sind CD8⁺T-Zellen, ebenso wie CD4⁺T-Zellen, eine wichtige IFN γ -Quelle und können dadurch die mikrobizide Aktivität von Makrophagen steigern.

CD8⁺T-Zellen kommt bei der Immunabwehr von Rickettsien eine entscheidende Rolle zu. Eine erhöhte zytotoxische Aktivität von CD8⁺T-Zellen ließ sich sowohl bei *R. conorii*- als auch *R. australis*-infizierten C3H/HeN-Mäusen nachweisen [165]. Die Depletion dieser T-Zellpopulation führte bei *R. conorii*- und *R. typhi*-infizierten C3H/HeN-Mäusen zu einer deutlich erhöhten Bakterienlast und Sterblichkeit [106, 163]. Darüber hinaus waren C57BL/6 MHC^I^{-/-}-Mäuse, die keine funktionellen CD8⁺T-Zellen ausbilden können, im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp-Mäusen, wesentlich anfälliger gegenüber einer Infektion mit *R. australis*. Hier nahm die Infektion bereits bei einer sehr geringen Dosis *R. australis* einen tödlichen Verlauf [165]. Die protektive Funktion von CD8⁺T-Zellen zeigte sich ebenfalls in adoptiven Transferexperimenten. *R. conorii*-infizierte C3H/HeN-Mäuse waren nach Applikation immuner CD8⁺T-Zellen vor einer normalerweise tödlichen Dosis *R. conorii* geschützt [163].

Ob die zytotoxische Aktivität oder die Freisetzung von IFN γ für die schützende Funktion der CD8⁺T-Zellen gegenüber Rickettsien von größerer Bedeutung ist, ist bislang nicht vollständig geklärt. Für die Eliminierung von *R. australis* scheint die zytotoxische Aktivität der CD8⁺T-Zellen die entscheidendere Rolle zu spielen. Zwar wiesen sowohl C57BL/6 Perforin^{-/-}- als auch C57BL/6 IFN γ ^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *R. australis* auf, im Vergleich waren C57BL/6 Perforin^{-/-}-Mäuse jedoch anfälliger für den Erreger [165]. Darüber hinaus führte ein Transfer von immunen CD8⁺IFN γ ^{-/-}-T-Zellen in *R. australis*-infizierte C57BL/6 IFN γ ^{-/-}-Mäuse zu einer deutlich reduzierten Erregerlast [165].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren wurde vermehrt von Patienten berichtet, bei denen endemisches Fleckfieber diagnostiziert wurde [22, 81, 84, 101, 169]. Die dokumentierten Fälle spiegeln dabei bei weitem nicht die realen Fallzahlen wieder, da das endemische Fleckfieber aufgrund seiner unspezifischen Symptomatik und des geringen Bekanntheitsgrads häufig unter- oder fehl-

1 Einleitung

diagnostiziert wird. Zwar stehen nach richtiger Diagnose Antibiotika zur Behandlung des endemischen Fleckfiebers zur Verfügung, ein Impfstoff wurde bisher jedoch nicht entwickelt. Mit steigenden Fallzahlen nimmt die Entwicklung eines Impfstoffs an Bedeutung zu. Die grundlegende Voraussetzung hierfür ist das Verständnis von Immunmechanismen, die zum Schutz vor der Erkrankung beitragen. Über die Immunabwehr gegenüber Rickettsien ist bislang jedoch nur wenig bekannt. Die meisten immunologischen Erkenntnisse beruhen hierbei auf Ergebnissen, die mit Rickettsien der Fleckfiebergruppe erzielt wurden. Ein Grund für die unzureichende Erforschung der Immunantwort gegenüber *R. typhi* war ein Mangel an geeigneten Infektionsmodellen. In den vergangenen Jahren konnten mit T- und B-Zell-defizienten C57BL/6 RAG1^{-/-}- und CB17 SCID-Mäusen jedoch zwei geeignete Modelle für die Infektion mit *R. typhi* etabliert werden. Anders als C3H/HeN-Mäuse, die bislang als Infektionsmodell verwendet wurden, sind diese Mäuse hoch suszeptibel für die Infektion mit *R. typhi*. C57BL/6 RAG1^{-/-}- und CB17 SCID-Mäuse eignen sich daher sehr gut, um die schützende Funktion von Komponenten des adaptiven Immunsystems durch Substitution zu untersuchen. Da die T-Zell-vermittelte Immunantwort für die Abwehr von *R. typhi* offenbar von großer Bedeutung ist, sollte diese im Rahmen der Arbeit zunächst in C57BL/6- und BALB/c-Wildtyp-Mäusen charakterisiert werden. Unter Verwendung verschiedener Knockout-Mauslinien und neutralisierender Antikörper sollte im Anschluss analysiert werden, welche funktionellen Voraussetzungen für einen T-Zell-vermittelten Schutz bei einer Infektion mit *R. typhi* erforderlich sind.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav 6464L	Schlumbohm Medizintechnik, Hamburg
CO ₂ -Inkubator Heracell 150	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Digitalwaage	Sartorius, Göttingen
Durchflusszytometer Accuri™ C6	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer LSRII	Becton Dickinson, Heidelberg
EasySep TM Magnet	STEMCELL, Vancouver, Kanada
Elektronische Pipettierhilfe Accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Flüssigstickstoffbehälter	AIR LIQUIDE Medical, Düsseldorf
γ-Bestrahlungsgerät	STS, Braunschweig
Kühl- und Gefrieranlagen	Liebherr, Bulle, Schweiz
MagniSort® Magnet	eBioscience, Frankfurt am Main
Mehrkanalpipetten	HTL Lab Solution, Warschau, Polen
Mikroplattenleser Dynex MRX II	Dynex, Denkendorf
Mikroskop BZ9000	Keyence, Neu-Isenburg
Mikroskop CKX41SF	Olympus, Hamburg
Mikroskop Wilovert	Helmut Hund, Wetzlar
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Walham, USA
pH-Meter pH211	HANNA Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
	Gilson, Limburg
Percellys 24-Homogenisator	PEQLAB, Erlangen
Präzisionswaage Ohaus CS200	Ohaus, Parsippany, USA
Präzisionswaage SI-2002	Denver Instrument, Göttingen
Reflotron® Plus	Roche, Grenzach-Wyhlen
Rotor Gene 6000	QIAGEN, Hilden
Thermomagnetrührer RET-GS	IKA® -Werke, Staufen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

2 Material

Sicherheitswerkbank SterilGard III Advanced	The Baker Company, Stanford, USA
Sicherheitswerkbank FlowSafe® B-[MaxPro] ³ 130	Berner, Elmshorn
VENTANA BenchMark XT	Roche, Grenzach-Wyhlen
Vortexmischer VF2	IKA®-Werke, Staufen
Wasserbad Alpha A	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Zählkammer Neubauer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1,0 R	Thermo Electron, Langenselbold
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Walham, USA
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Osterode

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Accu-Chek Softclix Lanzetten	Roche, Grenzach-Wyhlen
Deckgläschen	Engelbrecht Labortechnik, Edermünde
Einmalskalpelle	B. Braun, Melsungen
Einmalspritzen Injekt® (1 ml, 2 ml, 5 ml)	B. Braun, Melsungen
EDTA-Röhrchen	Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth
Einmalkanülen Sterican®	B. Braun, Melsungen
Ethanol	Merck, Darmstadt
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon™ Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Flaschenaufsatzfilter Steritop™	Merck, Darmstadt
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PCR-Reaktionsgefäße	QIAGEN, Hilden
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Schottflaschen	Schott, Mainz
Siliciumcarbid-Partikel (60/90)	Lortone, Inc., Mukilteo, USA
Spritzenfilter Whatman® Puradisc 25	GE Healthcare, Freiburg
Zellkulturplatte 6-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2 Material

Zellkulturplatte 24-Well, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte 96-Well, U-Form	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsiebe 70 µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellsiebe CellTrics [®] 30 µm	Sysmex Partec, Görlitz
Teststreifen Reflotron [®] GPT	Roche, Grenzach-Wyhlen

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.3: Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Ampuwa [®]	Fresenius, Bad Homburg
Cohn-Fraktion II Globuline	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DPBS (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)	PAN-Biotech, Aidenbach
Einbettmedium Tissue Tek [®] Compound	Sakura Finetek, Staufen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FCS (<i>Fetal Calf Serum</i>)	PAA Laboratories, Cölbe
Formaldehydlösung 37 %ig	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gentamycin	PAA Laboratories, Cölbe
GolgiStop	Becton Dickinson, Heidelberg
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IMDM (<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>)	PAA Laboratories, Cölbe
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin	Life Technologies, Eggenstein
L929-M-CSF (<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)-Überstand	BNITM, Hamburg
N-(1-Naphthyl)ethylendiamindihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumazid	Roche, Grenzach-Wyhlen
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
OneComp eBeads	eBioscience, Frankfurt am Main
Phorbolmyristat (PMA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Pferdeserum	Biochrom, Berlin

2 Material

RPMI-1640	PAA Laboratories, Cölbe
Salzsäure 25%ig	Carl Roth, Karlsruhe
Sulfonamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TBS (<i>Tris-Buffered Saline</i>)	Zytomed Systems, Berlin
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Zytomed Systems, Berlin
Trypanblau 0,4%ig	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ziegenserum	DIANOVA, Hamburg

2.4 Kits

Tabelle 2.4: Kits

Kit	Hersteller
Cytofix/Cytoperm TM Solution Kit	Becton Dickinson, Heidelberg
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt am Main
LEGENDplex TM Multi-Analyte Flow Assay Kit	BioLegend, London, UK
MagniSort® Mouse CD4 T cell Enrichment Kit	eBioscience, Frankfurt am Main
MagniSort® Mouse CD8 T cell Enrichment Kit	eBioscience, Frankfurt am Main
Precellys® Keramik-Kit	PEQLAB, Erlangen
UltraView Universal DAB Detection Kit	Roche, Grenzach-Wyhlen
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit	QIAGEN, Hilden

2.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.5: Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Citratpuffer	10 mM Natriumcitrat 0,05 % Tween20 pH 6
Cohn-II-Lösung	5% Cohn-Fraktion II Globuline in FACS-Puffer
Erythrozytenlysepuffer	10% (v/v) 0,1 M TRIS (pH 7,5) 90% (v/v) 155 mM NH ₄ Cl

2 Material

Einfriermedium (2x)	20% (v/v) DMSO in FCS
FACS-Puffer	1% (v/v) FCS 0,01% (w/v) NaN ₃ in PBS
Griess-1-Lösung	1% (w/v) Sulfonamid in 1M HCl
Griess-2-Lösung	0,3% (w/v) N-(1-Naphthyl)ethylendiamindihydrochlorid in dH ₂ O
IMDM _{complete}	500 ml IMDM 50 ml FCS 5 ml L-Glutamin 2,5 ml Gentamicin
IMDM _{incomplete}	500 ml IMDM 50 ml FCS 5 ml L-Glutamin
PBS (20x)	2,7 M NaCl 54 mM KCl 87 mM Na ₂ HPO ₄ x ddH ₂ O 30 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Zellkulturmedium (L929)	500 ml RPMI-1640 50 ml FCS 10 ml L-Glutamin 5 ml HEPES 5 ml Gentamicin

2 Material

Zellkulturmedium (Makrophagen)	5% (v/v) Pferdeserum 10% (v/v) L929-M-CSF-Überstand in IMDM _{complete}
Zellseparationspuffer	3% (v/v) FCS 2% (v/v) 0,5 M EDTA in PBS

2.6 Antikörper

Tabelle 2.6: Antikörper

Antikörper	Klon	Verwendung	Hersteller
anti- <i>R. typhi</i>	BN152	1:50	BNITM, Hamburg
anti-Maus CD3	SP7	1:100	Abcam, Cambridge, UK
anti-Maus CD4-FITC	H129.19	1:200	eBioscience, Frankfurt am Main
anti-Maus CD4-PE	GK1.5	1:200	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-Maus CD8a-APC	53-6.7	1:200	BioLegend, London, UK
anti-Maus CD8a-PerCP-Cy5.5	53.6.7	1:200	eBioscience, Frankfurt am Main
anti-Maus CD11a-eFluor450	M17/4	1:200	BioLegend, London, UK
anti-Maus Granzym B-Pacific Blue	GB11	1:20	BioLegend, London, UK
anti-Maus IBA1	Nr. 019-19741	1:500	Wako, Neuss
anti-Maus IL-17 <i>in vivo</i> -Verwendung	13F3	500µg	BioXCell, West Lebanon, USA
anti-Maus iNOS	ABIN373696	1:75	Abcam, Cambridge, UK
anti-Maus IFNγ-PE/Dazzle	XMG1.2	1:333,3	BioLegend, London, UK
anti-Maus KLRG1-PE	2F1/KLRG1	1:800	BioLegend, London, UK
anti-Maus TNFα-BV510	MP6-XT22	1:40	BioLegend, London, UK
anti-Maus TNFα <i>in vivo</i> -Verwendung	XT3.11	500µg	BioXCell, West Lebanon, USA
Histofine® Simple Stain Mouse Max PO anti-Kaninchen	414341F	Tropfen	Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan
Histofine® Simple Stain Mouse Max PO anti-Ratte	414311F	Tropfen	Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan
Isotyp Ratte IgG1 x BV510	RTK2071	1:40	BioLegend, London, UK
Isotyp Ratte IgG1 x PE/Dazzle	RTK2071	1:333,3	BioLegend, London, UK
Isotyp IgG1 anti-HRP <i>in vivo</i> -Verwendung	HRPN	500µg	BioXCell, West Lebanon, USA

2.7 Proteine

Tabelle 2.7: Proteine

Bezeichnung	Hersteller
Rekombinantes IFN γ	PeproTech, Hamburg
Rekombinantes TNF α	PeproTech, Hamburg

2.8 Zelllinien

Tabelle 2.8: Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Beschreibung
L929	Maus (C3H/An)	adhärent wachsende, Fibroblasten-ähnliche Zelllinie (ATCC CCL-1)

2.9 Bakterienstämme

Tabelle 2.9: Bakterienstämme

Bakterienstamm
<i>Rickettsia typhi</i> Wilmington (ATCC VR-144)

2.10 Nukleinsäuren

Tabelle 2.10: Nukleinsäuren

Bezeichnung	Sequenz
PrsA-fw	5'-ACA GCT TCA AAT GGT GGG GT-3'
PrsA-rv	5'-TGC CAG CCG AAA TCT GTT TTG-3'

2.11 Mausstämme und -linien

Tabelle 2.11: Mausstämme und -linien

Mausstamm/-linie	Herkunft
BALB/c	BNITM, Hamburg
BALB/c IFN γ ^{-/-}	BNITM, Hamburg
BALB/c Perforin ^{-/-}	BNITM, Hamburg
BALB/c RAG2 ^{-/-}	UKE, Hamburg
CB17 SCID	BNITM, Hamburg
C57BL/6	BNITM, Hamburg
C57BL/6 MHC I ^{-/-}	BNITM, Hamburg
C57BL/6 MHC II ^{-/-}	BNITM, Hamburg
C57BL/6 RAG1 ^{-/-}	BNITM, Hamburg

2.12 Software

Tabelle 2.12: Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism Version 5.02	GraphPad Software, La Jolla, USA
FlowJo 10.2	Treestar, Ashland, USA
LEGENDplex™ Version 7.0	BioLegend, London, UK
Rotor Gene 6000 Series Software	QIAGEN, Hilden

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der zu quantifizierenden Zellsuspension mit Trypanblau (1:10) versetzt. Trypanblau durchdringt die perforierte Membran abgestorbener Zellen und färbt diese tiefblau. Die Zellen können somit von vitalen, mikroskopisch hell erscheinenden, Zellen unterschieden werden. Die Zellanzahl wurde nach der Auszählung zweier Großquadrate einer Neubauerzählkammer mit der folgenden Formel ermittelt:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{2} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 * \text{Gesamtvolumen}$$

3.1.2 Kultivierung von L929-Zellen

Alle Arbeitsschritte der Zellkultur fanden unter sterilen Bedingungen an einer Reinluftworkbank statt. Die verwendeten Materialien und Lösungen wurden entweder steril erworben oder einer Dampf- bzw. Heißluftsterilisation unterzogen. Die Kultivierung von L929-Zellen erfolgte in sterilem Medium bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Nach Erreichen einer Konfluenz >80 % folgte das Passagieren der Zellen. Hierbei wurde eine 1 : 2 Verdünnungsreihe in einer neuen 6-Well-Zellkulturplatte (5 ml/Well) angefertigt. Die Zellkultur wurde in regelmäßigen Abständen bezüglich ihrer Morphologie, Zelldichte und eventuell auftretender Kontaminationen mikroskopisch betrachtet.

3.1.3 Kultivierung und Isolierung von *R. typhi*

Die Kultivierung von *R. typhi* erfolgte in L929-Zellen. Diese wurden einen Tag vor der Infektion γ -bestrahlt (1966 rad, 560 sec) und in Zellkulturflaschen (1x10⁷ Zellen/175 cm² Flasche) mit Antibiotika-freiem Zellkulturmedium ausgesät. Darauf folgte die Inokulation der Zellen mit *R. typhi* (1-10 μ l Überstand einer Vorkultur). Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und der Infektionsstatus der Zellen regelmäßig mikroskopisch begutachtet. Abhängig vom Fortschritt der Infektion wurden die Bakterien 4 bis 7 Tage nach Inokulation

3 Methoden

aus den Zellen isoliert. Hierfür wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Zellkulturflaschenboden gelöst und inklusive des Überstands in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 272 x g, 4 °C), mit Antibiotika-freiem Zellkulturmedium (1,5 ml/1x10⁷ Zellen) resuspendiert und vereint. Anschließend erfolgte die Verteilung der Zellsuspension auf 2 ml-Reaktionsgefäße, in denen 200 µl Siliciumcarbid-Partikel vorgelegt waren. Die Zellen wurden unter Verwendung eines Vortexmischers (1 min, 2500 min⁻¹) aufgeschlossen und die Bakterien durch einen Spritzenfilter (2 µm) von größeren Zellbestandteilen separiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (5 min, 6200 x g, RT) und die Bakterien in FCS aufgenommen (2 ml/175 cm² Zellkulturflasche). In Kryoröhrchen wurde die Bakterien-suspension 1 : 1 mit Einfriermedium vermischt und zunächst für 24 h in der Stickstoffdampfphase gelagert. Die langfristige Aufbewahrung der Bakterien erfolgte in flüssigem Stickstoff. Der *R. typhi*-Gehalt in den Röhrchen wurde mittels qPCR bestimmt (Abschn. 3.2.5).

3.1.4 Präparation muriner Milzzellen

Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und mithilfe eines Spritzenstempels in PBS homogenisiert. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (70 µm) gegeben und zentrifugiert (5 min, 272 x g, 4 °C). Anschließend erfolgte die Lyse der Erythrozyten. Hierfür wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und für 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 15 ml PBS gestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde das Pellet in Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellzahl ermittelt (Abschn. 3.1.1).

3.1.5 Präparation muriner Gehirnzellen

Nach Organentnahme wurde das Gehirn in ein mit PBS gefülltes Well einer 6-Well-Zellkulturplatte überführt und mit einem Spritzenstempel homogenisiert. Die Zellsuspension wurde wiederholt durch die Kanüle (Ø 0,9 mm) einer Spritze gezogen und anschließend mit einem Zellsieb (30 µm) filtriert. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 272 x g, 4 °C) und in 2 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Lyse durch die Zugabe von 10 ml FACS-Puffer gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und für durchflusszytometrische Analysen gefärbt (Abschn. 3.2.7.3).

3.1.6 Anreicherung von T-Zellen aus der Milz

Die Anreicherung von CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen erfolgte durch immunomagnetische Zellseparation. Bei diesem Verfahren werden alle unerwünschten Zellen zunächst mit einem Biotin-gekoppelte Antikörper markiert. Durch die Zugabe Antikörper-beschichteter Magnetpartikel, die sich gegen Biotin richten, können die markierten Zellen im Magnetfeld von den Zielzellen separiert werden.

3 Methoden

Für die T-Zellanreicherung wurde die Milz entnommen und die Milzzellen, wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, isoliert. Die Separation der Zellen erfolgte unter Verwendung des Magni-Sort[®] CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellanreicherungskits der Firma eBioscience und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Überprüfung der T-Zellreinheit wurde der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen nach der Anreicherung durchflusszytometrisch analysiert (Abschn. 3.2.7.1).

3.1.7 Generierung von Knochenmarkmakrophagen

Murine Knochenmarkstammzellen wurden aus den Ober- und Unterschenkelknochen von C57BL/6- oder BALB/c-Mäusen gewonnen. Hierfür wurden Tibia und Femur unter sterilen Bedingungen entnommen und mithilfe eines Skalpells vom Muskelgewebe befreit. Das Knochenmark wurde im Anschluss mit einer PBS-gefüllten Spritze herausgespült und resuspendiert. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 272 x g, 4 °C) und in Zellkulturmedium aufgenommen. Das verwendete Zellkulturmedium enthielt den Wachstumsfaktor M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), der für die Differenzierung der Zellen in Makrophagen benötigt wird. Anschließend wurde die Zellzahl ermittelt (Abschn. 3.1.1) und 2x10⁶ Zellen in 10 ml Medium pro Petrischalen ausgesät. Alle 3 Tage erfolgte die Zugabe von 2 ml frischem Zellkulturmedium. Nach 12-tägiger Kultivierung wurden die Makrophagen geerntet. Hierfür wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischale gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 272 x g, 4°C). Das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und in IMDM_{incomplete}-Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Knochenmarkmakrophagen für *in vitro*-Versuche verwendet (Abschn. 3.1.8).

3.1.8 Infektion von Knochenmarkmakrophagen und Kokultivierung mit T-Zellen und rekombinanten Zytokinen *in vitro*

Die Infektion der Knochenmarkmakrophagen erfolgte in 24-Well-Zellkulturplatten. Hierfür wurden zunächst 1x10⁶Zellen pro Well in 500 µl IMDM_{incomplete}-Medium ausgesät und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 5x10⁶ *R. typhi* in 500 µl Medium. Die Zellen wurden für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Freie Bakterien wurden anschließend durch einen Mediumwechsel entfernt. Am Folgetag wurden CD4⁺T-Zellen aus naiven und immunen BALB/c- oder C57BL/6-Mäusen isoliert (Abschn. 3.1.6). 1x10⁶ der gereinigten T-Zellen wurden in 500 µl Medium zu den infizierten Makrophagen gegeben. Zeitgleich erfolgte bei einigen Ansätzen die Neutralisation von IFN γ und/oder TNF α , um so die Bedeutung der Zytokine für die T-Zell-vermittelte Aktivierung von Makrophagen zu untersuchen. Hierfür wurden die neutralisierenden Antikörper in 500 µl Medium (10 µg/ml) zu den Kokulturen gegeben. Kontrollansätze erhielten Medium ohne Antikörper. Nach 72 h Kokultur wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst und pelletiert

3 Methoden

(5 min, 6200 x g, RT). In den Zellkulturüberständen wurde die NO- und Zytokinkonzentration (Abschn. 3.2.3 und 3.2.2) und im Pellet die Bakterienlast (Abschn. 3.2.5) bestimmt.

Der direkte Einfluss von IFN γ und TNF α auf die bakterizide Aktivität *R. typhi*-infizierter Makrophagen wurde durch Zugabe von rekombinantem IFN γ und/oder TNF α untersucht. Hierzu wurden die infizierten Makrophagen mit rekombinanten Zytokinen (IFN γ 1 U/ml, TNF α 400 U/ml) anstatt mit T-Zellen inkubiert. Gleichzeitig wurde IFN γ und/oder TNF α bei einigen Ansätzen, wie zuvor beschrieben, durch Antikörper neutralisiert. Auch hier erfolgte die Analyse der NO- und Zytokinkonzentration in den Überständen sowie die Bakterienlast in den Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 h.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Bestimmung der GPT-Konzentration im Serum

Die Quantifizierung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Serum erfolgte mit dem Reflotron-System der Firma Roche. Die Probenvorbereitung sowie die Bestimmung der GPT-Konzentration wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch die Analysen konnten Rückschlüsse auf den Zustand der Leber gezogen werden, da eine erhöhte GPT-Konzentration im Blut auf eine Schädigung des Organs hinweist.

3.2.2 Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum und im Zellkulturüberstand

Die Analyse der Zytokinkonzentration in Seren und Zellkulturüberständen erfolgte mit dem LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit. Das Verfahren basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-Assays, bei dem das nachzuweisende Antigen von zwei unterschiedlichen Antikörpern gebunden wird. Die löslichen Zytokine binden zunächst an spezifische Bead-gekoppelte Antikörper. Die eingesetzten Beads unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Größe und Fluoreszenzintensität, wodurch die zeitgleiche Analyse verschiedener Zytokine ermöglicht wird. Der Nachweis der gebundenen Zytokine erfolgt durch die Zugabe eines zweiten, biotinylierten, Antikörpers in Kombination mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin. Die Fluoreszenzintensität gibt folglich Aufschluss über die Menge des Analyten.

Die Untersuchung erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei das Volumen der eingesetzten Proben und Reagenzien halbiert wurde. Für die Messung der Proben wurde das Durchflusszytometer Accuri C6 verwendet. Die Daten wurden mit der herstellereigenen Software LEGENDplex™ Version 7.0 ausgewertet.

3.2.3 Detektion von Stickstoffmonoxid

Nach Aktivierung sind Makrophagen in der Lage große Mengen NO zu sekretieren, das der Abtötung eingedrungener Pathogene dient. Die Freisetzung von NO durch Makrophagen wurde in Zellkulturüberständen mittels Griess-Reaktion analysiert. Bei dieser Methode wird die Bildung von NO indirekt über die Oxidationsprodukte Nitrit und Nitrat nachgewiesen. Für die Analyse wurde 100 µl Zellkulturüberstand in einer 96-Well-Zellkulturplatte mit je 50 µl Griess-1- und Griess-2-Lösung versetzt. Für die Quantifizierung der NO-Produktion wurde zusätzlich eine Standardreihe mit definierten NaNO₂-Konzentrationen mitgeführt. Die Azukupplung von Nitrit an das Griess-Reagenz (N-(1-Naphthyl)ethylendiamindihydrochlorid) führt zu einer Farbreaktion, die photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm quantifiziert wurde.

3.2.4 DNA-Extraktion aus Organen und Zellkulturen

Für die Isolierung von DNA aus Organen wurde das Gewebe zunächst mithilfe des Precellys® Keramik-Kits homogenisiert. Dazu wurden 10 mg des isolierten Organs in ein Precellys-Röhrchen gegeben und mit 500 µl PBS versetzt. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Organprobe unter Verwendung des Precellys 24-Homogenisators (6000 rpm, 2 x 45 sec). Die DNA-Extraktion wurde daraufhin mit dem QIAamp DNA Mini Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Eingesetzt wurden 80 µl Gewebesuspension bzw. 1x10⁶ kultivierte Zellen. Die Konzentration der aufgereinigten DNA-Proben wurde mit dem Spektralphotometer Nanodrop® 2000c bestimmt.

3.2.5 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion bezeichnet eine Methode, die der Amplifikation und Quantifizierung spezifischer DNA-Sequenzen dient. Im Gegensatz zur konventionellen PCR, ermöglicht die qPCR durch den Einsatz interkalierender Farbstoffe eine Echtzeit-Quantifizierung des Amplifikats. Die Detektion von *R. typhi* erfolgte über die Amplifikation eines 137 bp langen DNA-Fragments des *PrsA*-Gens (RT0565) [170]. Für die Quantifizierung wurde der Farbstoff SYBR Green I eingesetzt. Tabelle 3.1 führt die, für einen qPCR-Ansatz verwendeten, Reagenzien auf. Alle Reaktionen wurden in Duplikaten in einem Gesamtvolumen von je 10 µl durchgeführt. Um eventuell auftretende DNA-Kontaminationen zu detektieren, wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt.

3 Methoden

Tabelle 3.1: Reaktionsansatz für die *PrsA* qPCR

Reagenz	Konzentration
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	175 µM
forward Primer	100 nM
reverse Primer	100 nM
SYBR Green I	0,05x
Hotstar taq DNA Polymerase	0,025 U/µl
DNA	2 ng/µl in H ₂ O (Ampuwa®)

Die Quantifizierung der DNA erfolgte im Rotor Gene 6000 mit den in Tabelle 3.2 aufgeführten Einstellungen.

Tabelle 3.2: Temperaturprofil der *PrsA* qPCR

Phase	Temperatur / Zeit	
Vorheizen	95 °C / 15 min	
Denaturierung	94 °C / 20 sec	40 Zyklen
Annealing	53 °C / 30 sec	
Elongation	72 °C / 20 sec	

Zur Bestimmung der Anzahl an *PrsA*-Kopien wurde als Referenz Plasmid-DNA (pCR2.1-*PrsA*) mit bekannter Kopienzahl amplifiziert. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Rotor Gene 6000 Series Software.

3.2.6 *In vitro* Stimulation von Milzzellen

Für den Nachweis intrazellulärer Proteine wurde eine *in vitro*-Aktivierung der Zellen zur Stimulation der Proteinproduktion vorgenommen. Hierfür wurden die Zellen in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät (1x10⁶ Zellen in 200 µl Zellkulturmedium) und mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) behandelt. Die gleichzeitige Zugabe des Proteintransportinhibitors Monensin (GolgiStop 3,3 µl/ml) bewirkte die Akkumulation der Proteine in den Zellen. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellkulturplatten zentrifugiert (5 min, 272 xg, 4 °C), der Überstand verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zielproteine gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abschn. 3.2.7.1).

3.2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Charakterisierung von Zellen anhand von Größe, Granularität sowie fluoreszenzmarkierter zellulärer Strukturen. Die zu untersuchenden Zellen

3 Methoden

werden hierfür durch Druck in die Messkammer des Durchflusszytometers geleitet. Dort passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl. Die Streuung des Lichts gibt dabei Aufschluss über die Größe (Vorwärtsstreuung, *forward scatter* (FSC)) und Granularität (Seitwärtsstreuung, *side scatter* (SSC)) der Zellen. Darüber hinaus emittieren Fluoreszenzfarbstoffe Licht verschiedener Wellenlängen, wodurch sich zelluläre Bestandteile detektieren lassen, die direkt oder durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper markiert wurden. Bei der Verwendung verschiedener Fluorochrome kann es zu einer Überlappung der Emissionsspektren und somit zur Registrierung falsch positiver Signale kommen. Zur Korrektur spektraler Überlappungen muss vor der Probenmessung eine Kompensation erfolgen. Die Kompensation wurde mit OneComp eBeads von eBioscience entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Um Hintergrundsignale durch unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper aufzuzeigen, wurden Isotyp-Kontrollen mitgeführt. Die Messungen erfolgten am Durchflusszytometer LSR II oder Accuri C6. Mit der Software FlowJo 10.2 wurden die Daten ausgewertet.

3.2.7.1 Durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen

Färbung von Oberflächenproteinen

Zur Analyse von Oberflächenmolekülen wurden 1×10^6 Zellen in eine 96-Well-Zellkulturplatte oder ein FACS-Röhrchen überführt und pelletiert. Um F_c -Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu blockieren, wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C mit 20 µl Cohn-II-Lösung inkubiert. Daraufhin erfolgte die Färbung der Oberflächenproteine. Hierfür wurden die benötigten Antikörper in FACS-Puffer verdünnt (Tab. 2.6) und in einem Volumen von 50 µl zu den Zellen gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (5 min, 272 x g, RT). Erfolgte im Anschluss die Färbung intrazellulärer Proteine, wurde wie im nächsten Absatz beschrieben fortgefahren. Anderenfalls wurden die Zellen in 150 µl 1 %igem PFA aufgenommen und durchflusszytomtrisch analysiert.

Färbung intrazellulärer Proteine

Für die intrazelluläre Färbung von Proteinen wurden restimierte Milzzellen (Abschn. 3.2.6) unter Verwendung des Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Sets fixiert und permeabilisiert. Dazu wurden 1×10^6 Zellen in 50 µl Fixierungs-/Permeabilisierungslösung aufgenommen und für 30 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen (5 min, 272 x g, RT). Die Färbung der intrazellulären Proteine erfolgte nun durch die Zugabe fluoreszenzmarkierter Antikörper. Die verwendeten Antikörper wurden mit Permeabilisierungspuffer verdünnt (Tab. 2.6) und die Zellen in 50 µl dieser Antikörperlösung inkubiert. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 150 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Analyse der Zellen am Durch-

flusszytometer.

3.2.7.2 Durchflusszytometrische Analyse von Blutzellen

Für den Nachweis von CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen nach adoptivem Zelltransfer wurden 10 µl EDTA-Blut in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml Erythrozytenlysepuffer inkubiert. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Erythrozytenlyse durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer gestoppt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (5 min, 272 x g, RT) und in 100 µl Antikörperlösung aufgenommen. Die verwendeten Antikörper wurden hierfür 1:200 in FACS-Puffer verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Dunkeln erfolgte die Zugabe von 2 ml FACS-Puffer. Die Zellen wurden pelletiert und nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer in 150 µl 1 %igem PFA aufgenommen. Im Anschluss wurde der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.7.3 Durchflusszytometrische Analyse von Gehirnzellen

Für die durchflusszytometrische Analyse von Gehirnzellen wurden Aliquots der isolierten Zellen (Abschn. 3.1.5) zunächst in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer aufgenommen und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Perm/Wash-Puffer gewaschen (5 min, 272 x g, 4 °C) und die F_c-Rezeptoren durch Zugabe von 20 µl Cohn-II-Lösung blockiert. Danach erfolgte die intrazelluläre Färbung von *R. typhi*. Der hierfür verwendete Antikörper wurde in Perm/Wash-Puffer verdünnt (1:50) und in einem Gesamtvolumen von 20 µl zu den Zellen gegeben. Nach 20-minütiger Inkubation wurden die Zellen mit Perm/Wash-Puffer gewaschen (5 min, 272 x g, 4 °C). Um die gebundenen Antikörper detektieren zu können, wurden fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper verwendet. Diese wurden in Perm/Wash-Puffer verdünnt (1:100). Die Zellen wurden im Dunkeln mit 20 µl der Antikörperlösung inkubiert (20 min, 4 °C) und zweimal mit Perm/Wash-Puffer gewaschen. Anschließend folgte die Färbung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Markern durch die Zugabe der entsprechenden Antikörper. Die Antikörper wurden in Perm/Wash-Puffer verdünnt (Tab. 2.6) und in einem Volumen von 20 µl zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und für die durchflusszytometrische Analyse in 200 µl 1 %igem PFA aufgenommen.

3.2.8 Immunhistochemie

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden die entnommenen Organe zunächst in einer 4 %igen Formaldehydlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Gewebeschnitte wurden angefertigt, auf Objektträgern aufgebracht und für 20 min bei 65 °C fixiert. Das Gewebe wurde anschließend in Xylol für 30 min entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (3 x 3 min 100 % EtOH, 3 x 3 min 96 % EtOH, 3 min 80 % EtOH, 3 min 70 % EtOH) schrittweise

3 Methoden

rehydriert. Die Gewebeschnitte wurden in dH₂O gewaschen und zur Antigendemaskierung für 30 min in Citratpuffer erwärmt. Die immunhistochemische Färbung des Gewebes erfolgte mit einem Ventana BenchMark XT - Automaten. Die hierfür eingesetzten Antikörper wurden in 5 % Ziegenerum in TBS und 0,1 % Triton X100 in Antikörper-Diluent verdünnt (Tab. 2.6). Das Gewebe wurde für 1 h mit der Antikörperlösung inkubiert und daraufhin mit TBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurden Peroxidase-gekoppelte Antikörper verwendet. Mit diesen Antikörpern wurde das Gewebe für 30 min inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ultraView Universal DAB Detection Kit der Firma Ventana Medical Systems. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Einbettmedium eingedeckt. Alle immunhistochemischen Färbungen wurden am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Betrachtung der Gewebeschnitte erfolgte an einem BZ9000 Keyence Mikroskop.

3.3 Tierexperimentelle Methoden

Alle tierexperimentellen Studien wurden mit weiblichen Mäusen durchgeführt, die zum Versuchsbeginn ein Alter von 6-10 Wochen aufwiesen. Die Tiere wurden in einzelbelüfteten Käfigen (IVC, *individual ventilated cages*) in einer Anlage mit biologischer Sicherheitsstufe 3 gehalten.

3.3.1 Infektion von Mäusen mit *R. typhi*

Kryokonservierte Bakterien wurden aufgetaut und zweimal mit PBS gewaschen (5 min, 6200 x g, RT). Das Pellet wurde anschließend in PBS resuspendiert. Bei allen Versuchen wurde eine Infektionsdosis von 1×10^8 *R. typhi*-Kopien eingesetzt. Die Bakterien wurden in einem Volumen von 50 µl subkutan in die Schwanzbasis der Mäuse injiziert.

3.3.2 Beurteilung des Gesundheitszustands

Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde regelmäßig kontrolliert und bewertet. Da sich der Verlauf einer *R. typhi*-Infektion bei Mäusen auf BALB/c- und C57BL/6-Hintergrund stark unterscheidet, wurde der Gesundheitszustand der Mäuse anhand verschiedener Bewertungskriterien beurteilt. Bei Mäusen auf BALB/c-Hintergrund wurde der Fellzustand (0: normal, 1: im Nacken gestäubt, 2: am ganzen Körper gestäubt), die Aktivität (0: normal, 1: reduziert, 2: stark reduziert), die Körperhaltung (0: normal, 1: temporär gekrümmt, 2: permanent gekrümmt), die Futteraufnahme (0: normal, 1: reduziert, 2: keine) sowie der Gewichtsverlust (0: <10 %, 1: 10-15 %, 2: >15 %) bewertet. Die Bewertung dieser Kriterien ergab einen Score von 0 bis 10. Mäuse, die einen klinischen Score von 0 bis 4 erhielten, wurde als gesund eingestuft. Bei einem Score von 5 bis 7 galten die Tiere als moderat erkrankt und bei einem Wert ab 8 als schwer erkrankt [115].

3 Methoden

Kriterien für die Bewertung des Gesundheitszustands von Mäusen auf C57BL/6-Hintergrund waren die Körperhaltung und -bewegung (0: normal, 1: Tremor, 2: Ataxie/Parese, 3: Paralyse) sowie der Gewichtsverlust (0: <10 %, 1: 10-15 %, 2: >15 %). Hierbei ergab sich ein klinischer Score von 0 bis 5. Wurde der Gesundheitszustand mit 0 bis 1 bewertet, galten die Mäuse als gesund. Mäuse, die einem Wert von 2 bis 3 erhielten, wurden als moderat erkrankt und ab einem Score von 4 als schwer erkrankt eingestuft [114].

Schwer erkrankte Mäuse sowie Tiere mit einem Gewichtsverlust von mehr als 20 % wurden mit CO₂ erlöst und dieser Zeitpunkt als Todeszeitpunkt deklariert.

3.3.3 Blutentnahme

Der durchflusszytometrische Nachweis von T-Zellen erforderte nur sehr geringe Mengen Blut. Hierfür wurde die Schwanzvene punktiert und das gewonnene Blut in EDTA-Röhrchen überführt, um so die Gerinnung zu hemmen. Das Blut für die Gewinnung von Serum wurde aus der *Vena facialis* im Unterkieferbereich der Mäuse entnommen. Bei finalen Experimenten erfolgte die Blutentnahme aus dem Herzen narkotisierter Mäuse.

Um Serum zu erhalten, wurden die Blutproben für 20 bis 30 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 5654 x g, RT). Das abgesetzte Serum wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.4 Transfer von T-Zellen

Für den adoptiven Transfer von CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen in CB17 SCID-Mäuse wurden T-Zellen aus naiven BALB/c-Mäusen isoliert (Abschn. 3.1.6). Die Anreicherung von T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen wurde am 21. Tag nach *R. typhi*-Infektion durchgeführt. Die gereinigten Zellen wurden einen Tag vor *R. typhi*-Infektion in die laterale Schwanzvene der Mäuse injiziert. Einzige Ausnahme bildete ein Experiment, bei dem der T-Zelltransfer bereits 14 Tage vor der Infektion stattfand. Um die Applikation zu vereinfachen, wurde der Schwanz der Mäuse mit einer Rotlichtlampe erwärmt. Die Injektionsstelle wurde desinfiziert und 1x10⁶ der gereinigten CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen in 50 µl PBS injiziert. Kontrollmäusen wurde PBS anstelle von T-Zellen gespritzt. Eine Woche nach dem Transfer wurde der Anteil der T-Zellen im Blut mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abschn. 3.2.7.2).

3.3.5 Injektion von Antikörpern

Die Neutralisation von TNF α oder IL-17 erfolgte durch die Injektion von anti-TNF α bzw. anti-IL-17. Hierfür wurden 500 µg der neutralisierenden Antikörper in 200 µl PBS intraperitoneal injiziert. Die TNF α -neutralisierenden Antikörper wurden ab dem 3. Tag der Infektion in einem Abstand von 3 Tagen appliziert. Anti-IL-17 wurde im 2-Tages-Rhythmus injiziert.

3.3.6 Ethik

Alle Tierversuche wurden von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz Hamburg (Genehmigungsnummer 88/13) genehmigt und nach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.4 Statistik

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit der Software GraphPad Prism (Version 5.02) durchgeführt. Der statistische Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA (Kruskal-Wallis-Test) und anschließendem Post-hoc-Test (Dunn's post test). Unterschiede hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit wurden unter Verwendung des Log-rank (Mantel-Cox) Tests ermittelt. In allen Grafiken sind die Mittelwerte mit Standardfehler (SEM, *Standard error of the mean*) dargestellt.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung der T-Zell-vermittelten Immunabwehr für den Schutz gegenüber *R. typhi* in Mäusen zu untersuchen und Effektormechanismen zu ermitteln, die für diesen Schutz benötigt werden. Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Mauseinzuchtstämme verwendet. Es ist bekannt, dass sich der genetische Hintergrund auf die Immunantwort gegenüber Pathogene auswirkt [171]. So tendiert der Mausstamm C57BL/6 zu einer T_H1 -dominierten Immunantwort, während die Immunantwort von Mäusen auf BALB/c-Hintergrund T_H2 -assoziiert ist [172]. Die Rolle von T-Zellen bei der Bekämpfung einer *R. typhi*-Infektion wurde sowohl in Mäusen auf C57BL/6- als auch BALB/c-Hintergrund analysiert. Der erste und zweite Abschnitt des Ergebnisteils beschreibt die T-Zellantwort sowie die protektive Funktion von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in der *R. typhi*-Infektion. Der dritte Abschnitt beschäftigt sich mit der Untersuchung von Effektormechanismen, die für den T-Zell-vermittelten Schutz gegenüber *R. typhi* von Bedeutung sind.

4.1 Die Bedeutung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen für den Schutz von C57BL/6-Mäusen gegenüber *R. typhi*

4.1.1 C57BL/6-Mäuse generieren im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion eine langanhaltende $CD4^+T_H1$ - und zytotoxische $CD8^+$ T-Zell-Antwort

Eine *R. typhi*-Infektion ruft bei C57BL/6 Wildtyp-Mäusen keine Krankheitssymptome hervor. Dennoch lassen sich auch ein Jahr nach Infektion persistierende Bakterien in verschiedenen Organen nachweisen [114]. Die Bedeutung des erworbenen Immunsystems für die Kontrolle der Bakterien zeigt sich deutlich bei der Infektion von C57BL/6 $RAG1^{-/-}$ -Mäusen, denen das adaptive Verteidigungssystem fehlt [116]. Diese B- und T-Zell-defizienten Mäuse entwickeln Monate nach *R. typhi*-Infektion schwere neurologische Störungen, die letztendlich zum Tod der Tiere führen [114]. Da es sich bei *R. typhi* um ein intrazelluläres Bakterium handelt, wird vermutet, dass T-Zellen, insbesondere $CD8^+$ T-Zellen, eine bedeutende Rolle bei der Immunabwehr zukommt. Die T-Zellantwort im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion wurde daher zuerst in resistenten C57BL/6 Wildtyp-Mäusen charakterisiert, um so Anhaltspunkte zu erhalten, welche Effektorzellen für den Schutz vor der Erkrankung wichtig sind. Zunächst wurde analysiert, ob sich während einer *R. typhi*-Infektion eine Expansion von $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen nachweisen lässt. Dafür wurden Milzzellen *R. typhi*-infizierter C57BL/6-Mäuse zu verschie-

4 Ergebnisse

denen Zeitpunkten (Tag 3, 7, 15, 21, 35) nach Infektion isoliert, mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Kontrollmäuse (Tag 0) wurden mit PBS behandelt. In Abbildung 4.1 sind die prozentualen Anteile der CD4⁺ (A) und CD8⁺T-Zellen (B) an der Gesamtymphozytenpopulation dargestellt. Eine signifikante Veränderung des Anteils an CD4⁺ bzw. CD8⁺T-Zellen im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe ließ sich zu keinem Zeitpunkt der Infektion feststellen. Der prozentuale Anteil an CD4⁺T-Zellen lag durchschnittlich bei $19,3 \pm 0,4$ % und der der CD8⁺T-Zellen bei $13,6 \pm 0,3$ %. Am 7. Tag nach Infektion konnte ein leichter Anstieg der CD8⁺T-Zellpopulation ($16,4 \pm 0,8$ %) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($13,3 \pm 0,4$ %) verzeichnet werden, welcher jedoch nicht signifikant war (Abb. 4.1, B). Die Bestimmung der absoluten Zellzahlen im Verlauf der *R. typhi*-Infektion (Daten nicht gezeigt) deckte sich mit diesem Ergebnis. Ein Anstieg der Gesamtzahl an CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen wurde im Infektionsverlauf nicht beobachtet. Bei einer *R. typhi*-Infektion kommt es demnach zu keiner massiven Expansion spezifischer T-Zellen.

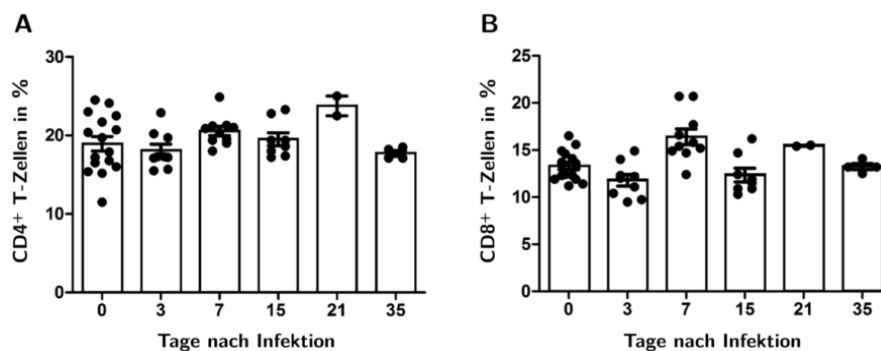


Abbildung 4.1: Prozentualer Anteil an CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen in der Milz von C57BL/6-Mäusen im Verlauf der Infektion mit *R. typhi*. Dargestellt ist der Anteil an CD4⁺ (A) und CD8⁺T-Zellen (B) in der Milz von C57BL/6-Mäusen zu den aufgeführten Zeitpunkten nach *R. typhi*-Infektion (Mittelwert ± SEM). Kontrollmäusen (Tag 0) wurde PBS anstelle von *R. typhi* injiziert. Die Daten wurden durchflusszytometrisch ermittelt. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test.

Um eine spezifische T-Zellantwort nachzuweisen, wurde der Anteil an Antigen-erfahrenen Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen im Verlauf der Infektion durchflusszytometrisch untersucht. Mithilfe der Marker CD11a und KLRG1 lassen sich naive CD8⁺T-Zellen von Antigen-erfahrenen, die diese Oberflächenproteine verstärkt exprimieren, unterscheiden [173, 174]. In Abbildung 4.2 ist der Anteil an CD11a- und KLRG1-exprimierenden CD8⁺T-Zellen im Infektionsverlauf dargestellt. Während der Infektion konnte eine signifikante Zunahme an CD11a-exprimierenden CD8⁺T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.2 A). Das Maximum zeigte sich dabei am 7. Tag nach Infektion. Im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle ($12,2 \pm 1,2$ %) ließen sich hier fast 3-mal so viele CD11a-exprimierende CD8⁺T-Zellen detektieren ($32,5 \pm 4,0$ %). Im weiteren Infektionsverlauf nahm der Anteil an Antigen-erfahrenen CD8⁺T-Zellen wieder ab und erreichte 35 Tage nach der Infektion ($13,5 \pm 1,2$ %) nahezu das Ausgangs-

4 Ergebnisse

niveau. Die Analyse des Anteils an KLRG1-exprimierenden CD8⁺T-Zellen ergab ein ähnliches Bild (Abb. 4.2 B). Auch hier zeigte sich der größte Anteil an terminal differenzierten CD8⁺T-Zellen am 7. Tag nach Infektion ($19,1 \pm 4,2$ %). Der prozentuale Anteil an CD8⁺KLRG1⁺T-Zellen nahm im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle ($1,1 \pm 0,2$ %) um mehr als das 17fache zu. Nach Erreichen des Maximums am 7. Tag nach Infektion sank der Anteil an CD8⁺KLRG1⁺T-Zellen deutlich ab. So ließen sich 15 Tage nach Infektion nur noch $2,3 \pm 0,1$ % KLRG1-exprimierende CD8⁺T-Zellen detektieren. Der Anteil an terminal differenzierten CD8⁺T-Zellen blieb bis zum 35. Tag nach Infektion ($2,3 \pm 0,3$ %) konstant und somit im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle leicht erhöht.

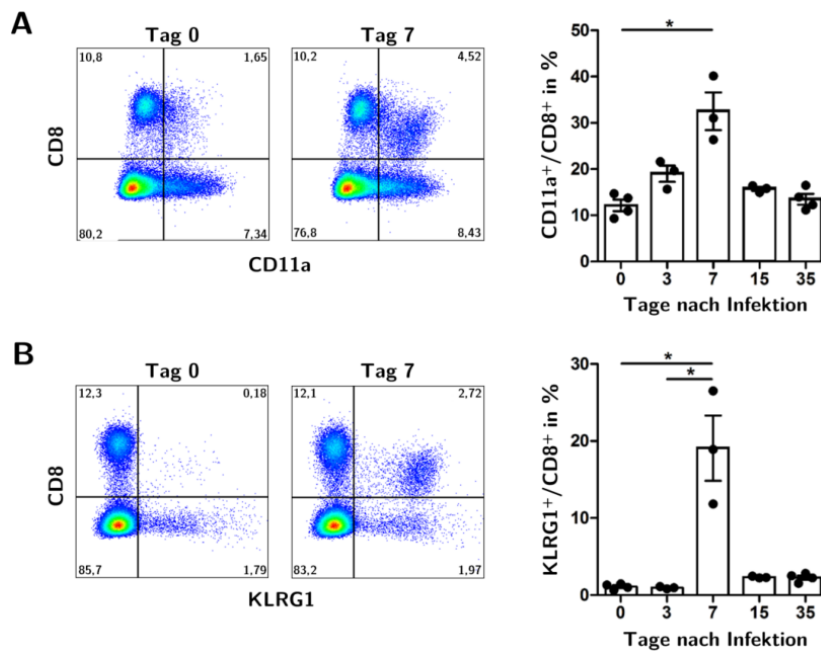


Abbildung 4.2: Nachweis Antigen-erfahrener CD8⁺T-Zellen im Verlauf der *R. typhi*-Infektion in C57BL/6-Mäusen Isolierte Milzzellen von nicht infizierten (Tag 0) und *R. typhi*-infizierten C57BL/6-Mäusen wurden zu angegebenen Zeitpunkten bezüglich der Expression von CD11a (A) und KLRG1 (B) auf CD8⁺T-Zellen untersucht. Gezeigt sind exemplarische Dot Plots je einer naiven und einer infizierten Maus 7 Tage nach Infektion (links). Der prozentuale Anteil an CD8⁺CD11a⁺ bzw. CD8⁺KLRG1⁺T-Zellen ist in den Diagrammen dargestellt (rechts) (Mittelwert $\pm$ SEM). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* $p < 0,05$).

Anschließend wurde die Effektorfunktion der CD8⁺T-Zellen analysiert. Hierfür wurden isolierte Milzzellen mit PMA/Ionomycin restimuliert und die Expression von IFN γ , TNF α und Granzym B im Infektionsverlauf durchflusszytometrisch untersucht. Die Expressionsanalyse der Effektormoleküle in CD8⁺T-Zellen ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

4 Ergebnisse

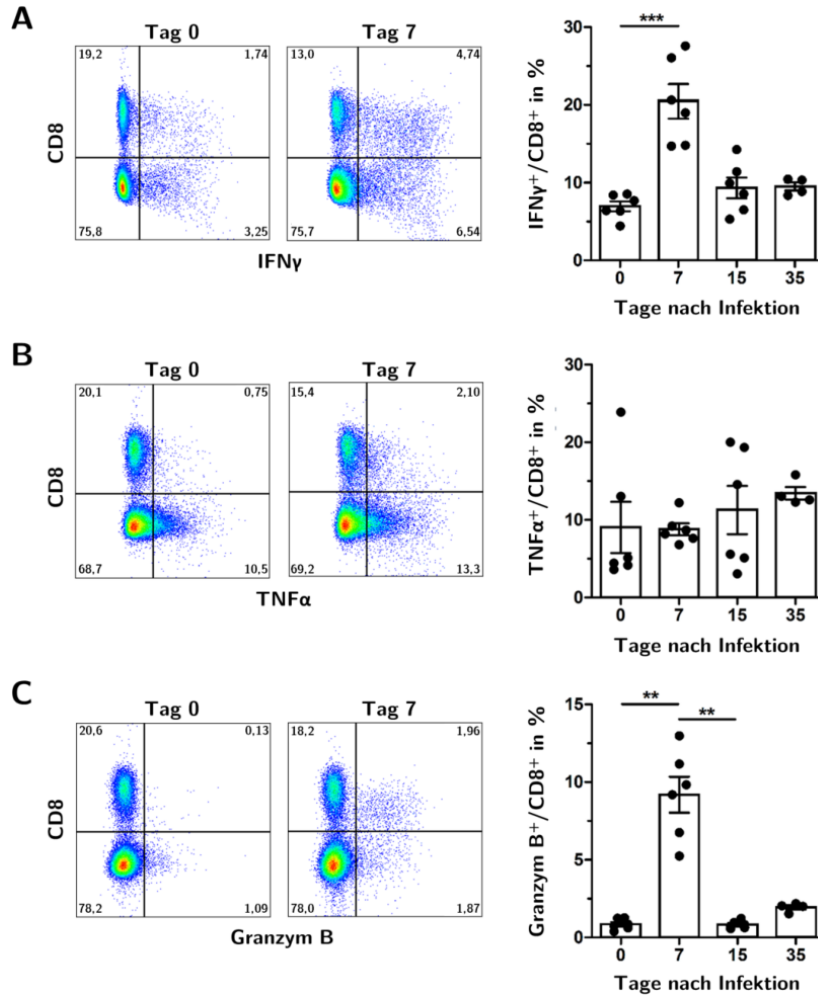


Abbildung 4.3: Eine *R. typhi*-Infektion führt bei C57BL/6-Mäusen zur Induktion einer zytotoxischen CD8⁺T-Zellantwort. CD8⁺T-Zellen aus der Milz *R. typhi*-infizierter C57BL/6-Mäuse wurden nach *in vitro* Restimulation mit PMA/Ionomycin hinsichtlich ihrer IFN γ - (A), TNF α - (B) und Granzym B-Expression (C) analysiert. Gezeigt sind exemplarisch Dot Plots der durchflusszytometrischen Expressionsanalyse von je einer naiven und einer *R. typhi*-infizierten Maus am 7. Tag nach Infektion (links). Die Frequenz der Effektorprotein-exprimierenden CD8⁺T-Zellen ist in den Diagrammen dargestellt (rechts) (Mittelwert $\pm$ SEM). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

In Übereinstimmung mit der Frequenzanalyse von Antigen-erfahrenen CD8⁺T-Zellen (Abb. 4.2) zeigte sich das Maximum IFN γ -exprimierender CD8⁺T-Zellen ($20,5 \pm 2,2$ %) ebenfalls 7 Tage nach Infektion (Abb. 4.3 A). Während bei der nicht infizierten Kontrolle nur $7,0 \pm 0,6$ % der CD8⁺T-Zellen IFN γ exprimierten, stieg der Anteil CD8⁺IFN γ ⁺T-Zellen hier um das 3fache. Die Frequenz IFN γ -exprimierender CD8⁺T-Zellen reduzierte sich 15 Tage nach Infektion ($9,3 \pm 1,3$ %), blieb jedoch im Vergleich zum Ausgangsniveau bis zum 35. Tag ($9,5 \pm 0,5$ %) leicht erhöht. Eine deutliche prozentuale Veränderung der TNF α -produzierenden CD8⁺T-Zellpopulation ließ sich im Infektionsverlauf nicht beobachten (Abb. 4.3 B). Am 7. Tag nach

4 Ergebnisse

R. typhi-Infektion zeigte sich ebenfalls eine signifikante Zunahme an zytotoxischen CD8⁺T-Zellen (Abb. 4.3 C). Im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe ($0,9 \pm 0,1$ %) konnte zu diesem Zeitpunkt ($9,2 \pm 1,2$ %) ein 10-mal höherer Anteil an Granzym B-exprimierenden CD8⁺T-Zellen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf nahm der Anteil zytotoxischer CD8⁺T-Zellen zunächst deutlich ab. Am 35. Tag nach Infektion ($1,9 \pm 0,1$ %) war jedoch wieder ein leichter, wenn auch nicht signifikanter, Anstieg Granzym B-produzierender CD8⁺T-Zellen zu verzeichnen.

Antigen-erfahrene CD4⁺T-Zellen zeichnen sich im Vergleich zu naiven CD4⁺T-Zellen ebenfalls durch eine erhöhte Expression von CD11a aus [175, 176]. Eine signifikante Veränderung der CD11a-Expression auf CD4⁺T-Zellen ließ sich im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion nicht nachweisen (Abb. 4.4). Tendenziell war der Anteil an CD4⁺CD11a⁺T-Zellen in infizierten Mäusen jedoch leicht erhöht und ein Maximum konnte am 7. Tag nach Infektion beobachtet werden. Die Frequenz von CD4⁺KLRG1⁺T-Zellen im Infektionsverlauf wurde nicht untersucht, da die Expression dieses Markers auf CD4⁺T-Zellen bei Mäusen der untersuchten Altersgruppe (6-10 Wochen) sehr gering ist und auch im Verlauf anderer Infektionen nicht ansteigt [177].

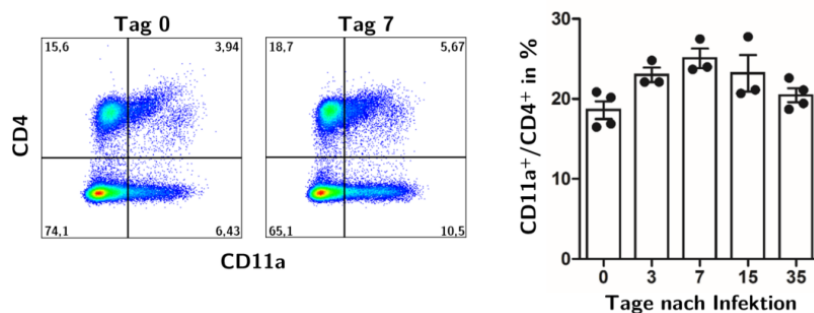


Abbildung 4.4: Expression von CD11a auf CD4⁺ T-Zellen im Verlauf der *R. typhi*-Infektion in C57BL/6-Mäusen. CD4⁺T-Zellen aus der Milz von nicht infizierten (Tag 0) und *R. typhi*-infizierten C57BL/6-Mäusen wurden hinsichtlich ihrer CD11a-Expression zu den aufgeführten Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind repräsentative Dot Plots für die Färbung von CD4⁺CD11a⁺ Milzzellen einer naiven und einer *R. typhi*-infizierten Maus am 7. Tag nach Infektion (links). Die prozentualen Anteile an CD11a-exprimierenden CD4⁺T-Zellen im Verlauf der Infektion sind im Diagramm dargestellt (rechts) (Mittelwert ± SEM). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test.

Das Ergebnis der Expressionsanalyse von IFN γ , TNF α und Granzym B in CD4⁺T-Zellen ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Im Verlauf der *R. typhi*-Infektion konnte in diesen Zellen ein signifikanter Anstieg der IFN γ -Produktion verzeichnet werden (Abb. 4.5 A). Im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle ($5,1 \pm 0,3$ %) ließ sich 7 Tage nach der Infektion ($13,8 \pm 0,9$ %) ein fast 3-mal so hoher Anteil IFN γ -exprimierender CD4⁺T-Zellen nachweisen. Der Anteil der IFN γ -Produzenten sank im weiteren Infektionsverlauf, blieb jedoch, verglichen zur Kontrolle bis zum 35. Tag ($8,3 \pm 0,8$ %), leicht erhöht. Eine signifikante Veränderung der TNF α -Expression in CD4⁺T-Zellen konnte zu keinem Zeitpunkt der Infektion beobachtet werden

4 Ergebnisse

(Abb. 4.5 B). Dennoch war ein kontinuierlicher Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ -synthetisierenden CD4^+ T-Zellen bis zum 35. Tag nach Infektion detektierbar. Der Anteil an Granzym B-exprimierenden CD4^+ T-Zellen blieb im Infektionsverlauf unverändert (Abb. 4.5 C). Ein Anstieg der zytotoxischen Aktivität der CD4^+ T-Zellen konnte im Verlauf der *R. typhi*-Infektion demnach nicht nachgewiesen werden.

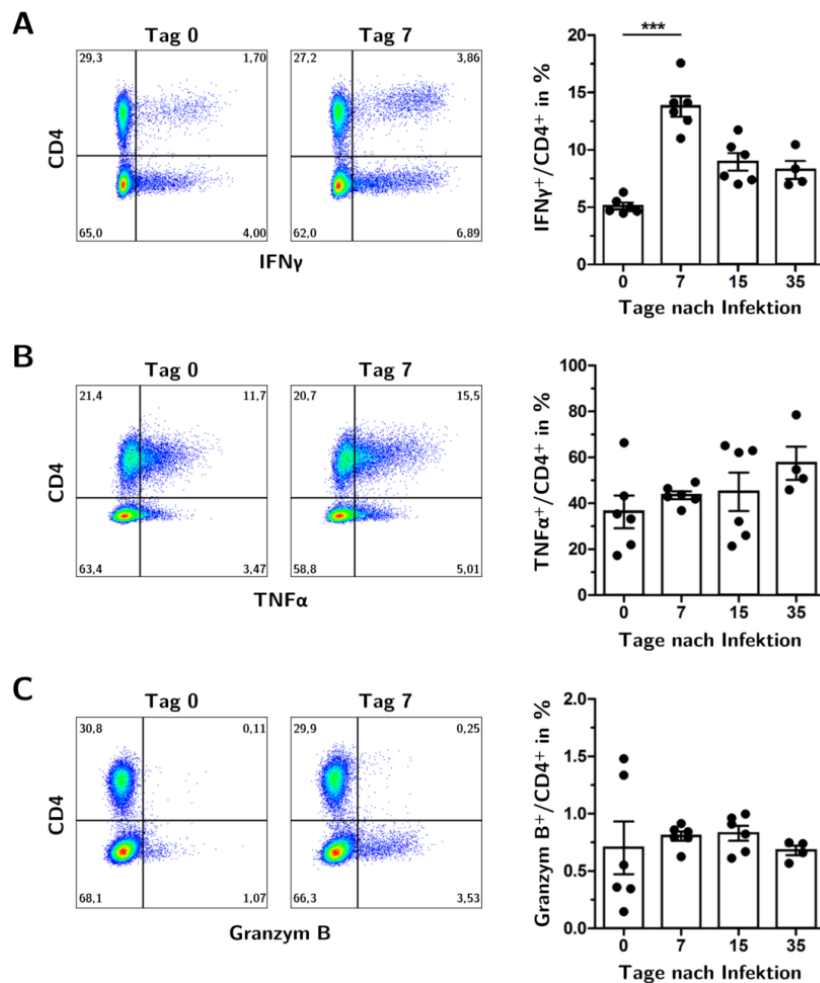


Abbildung 4.5: Im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion generieren C57BL/6-Mäuse eine $\text{CD4}^+\text{T}_\text{H}1$ -Antwort. Milzzellen von nicht infizierten und *R. typhi*-infizierten C57BL/6-Mäusen wurden *in vitro* mit PMA/Ionomycin restimuliert. Die Effektormoleküle IFN γ (A), TNF α (B) und Granzym B (C) wurden intrazellulär gefärbt und deren Expression in CD4^+ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Exemplarisch werden für die jeweilige Färbung Dot Plots einer naiven und einer infizierten Maus am 7. Tag nach Infektion gezeigt. In den Diagrammen ist der Anteil der Effektormolekül-exprimierenden CD4^+ T-Zellen zu den aufgeführten Zeitpunkten dargestellt (Mittelwert $\pm$ SEM). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (** $p < 0,001$).

Diese Daten zeigen, dass in C57BL/6-Mäusen im Verlauf der *R. typhi*-Infektion eine $\text{CD4}^+\text{T}_\text{H}1$ -Antwort eingeleitet wird, die durch eine gesteigerte Expression von IFN γ gekennzeichnet ist. Darüber hinaus kommt es zur Bildung zytotoxischer CD8^+ T-Zellen, die IFN γ und Granzym B

exprimieren.

4.1.2 Sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺T-Zellen schützen Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund vor einer *R. typhi*-bedingten Erkrankung

Nachdem gezeigt wurde, dass C57BL/6-Mäuse im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion funktionelle CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen generieren, sollte als nächstes untersucht werden, welchen Beitrag CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen zum Schutz vor der Erkrankung leisten. Hierfür wurden zuerst MHCI- bzw. MHCII-defiziente C57BL/6-Mäuse infiziert. Die Abwesenheit von MHCI oder MHCII führt zu einer defekten Ontogenese von CD8⁺ bzw. CD4⁺T-Zellen, da für das Überleben und die Reifung dieser T-Zellpopulationen der Kontakt des TZR zum MHC-Komplex notwendig ist. Somit führt das Unvermögen, MHCI-Moleküle zu exprimieren, zum Fehlen von CD8⁺T-Zellen [178, 179] und eine defekte MHCII-Synthese zur Abwesenheit von CD4⁺T-Zellen [180, 181]. Die Infektion MHCI- bzw. MHCII-defizienter Mäuse kann demnach Aufschluss darüber geben, ob CD4⁺ und/oder CD8⁺T-Zellen für den Schutz vor der Erkrankung verantwortlich sind. Es wurden daher sowohl C57BL/6 MHCI^{-/-}- als auch C57BL/6 MHCII^{-/-}-Mäuse mit *R. typhi* infiziert und deren Gesundheitszustand über einen Zeitraum von 150 Tagen dokumentiert. Die Beurteilung des Gesundheitszustands erfolgte mit einem Bewertungssystem, das ursprünglich für die Erkrankung von C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen definiert wurde. Diese T- und B-Zell-defizienten Mäuse entwickeln 3 bis 4 Monate nach *R. typhi*-Infektion neurologische Störungen und weisen eine hohe Erregerlast im Gehirn auf [114]. Zu Beginn der Erkrankung zeigen C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse zunächst leichte motorische Auffälligkeiten, wie Gleichgewichts- oder Koordinationsstörungen und Tremor. Im weiteren Verlauf folgen Schlaganfall-ähnliche Symptome und fortschreitende Lähmungserscheinungen, die letztendlich zum Tod der Mäuse führen [114]. Das System zur Beurteilung der Schwere der Erkrankung schließt sowohl den Grad der motorischen Einschränkung als auch die Veränderung des Gewichts ein. Ein klinischer Score von 1 entspricht dabei einer leichten und ein Wert von 5 einer schweren Erkrankung. Abbildung 4.6 zeigt die Überlebensrate, den klinischen Score sowie die relative Gewichtsveränderung der C57BL/6 MHCI^{-/-}- und MHCII^{-/-}-Mäuse im Infektionsverlauf. Überraschenderweise überlebten nicht nur MHCII-defiziente Mäuse, denen CD4⁺T-Zellen fehlen, sondern auch alle MHCI-defizienten Mäuse, die keine CD8⁺T-Zellen besitzen, eine Infektion mit *R. typhi*. Bei den infizierten Mäusen beider Gruppen konnten zu keinem Zeitpunkt der Infektion Krankheitssymptome beobachtet werden. Zudem war die relative Gewichtsveränderung der MHCI^{-/-}- und MHCII^{-/-}-Mäuse im Zeitverlauf vergleichbar mit der nicht infizierten Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis belegt, dass nicht nur CD8⁺T-Zellen, sondern auch CD4⁺T-Zellen einen ausreichenden Schutz gegenüber *R. typhi* vermitteln.

4 Ergebnisse

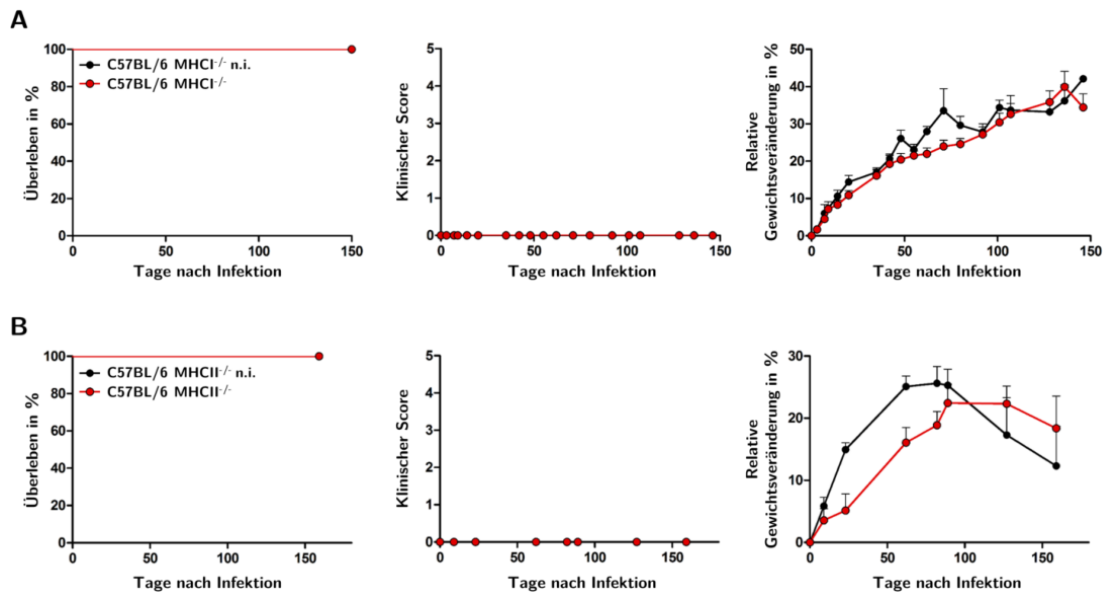


Abbildung 4.6: Sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺T-Zellen vermitteln Schutz vor *R. typhi*-bedingter Erkrankung. C57BL/6 MHCII^{-/-} (A) und C57BL/6 MHCII^{-/-}-Mäuse (B) wurden mit 1×10^8 *R. typhi* (s.c.) infiziert (rot). Nicht infizierte MHCII- bzw. MHCII-defiziente Mäuse wurden zur Kontrolle verwendet (schwarz). Gezeigt ist die Überlebensrate (links), der klinische Score (Mitte) und die relative Gewichtsveränderung (rechts) im Verlauf der Infektion. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert $\pm$ SEM; C57BL/6 MHCII^{-/-} n.i. n=6, *R. typhi* n=10; C57BL/6 MHCII^{-/-} n.i. n=11, *R. typhi* n=9)

Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺T-Zellen Schutz vermitteln, stellte sich die Frage, ob diese T-Zellpopulationen auch dann schützend wirken, wenn sich eine Infektion bereits etablieren konnte. Um dies herauszufinden, wurden adoptive T-Zelltransferexperimente in *R. typhi*-infizierte C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse durchgeführt. Der Aufbau dieser Experimente ist in Abbildung 4.7 schematisch dargestellt. C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse sind in der Lage, eine Infektion mit *R. typhi* über einen längeren Zeitraum zu kontrollieren. In diesem Zeitraum ist die Antigenkonzentration möglicherweise zu gering, um zeitnah eine effiziente T-Zellantwort hervorzurufen. Aus diesem Grund wurden für den T-Zelltransfer immune anstatt naive T-Zellen verwendet, da diese nach Antigenerkennung wesentlich schneller aktiviert werden. Die CD4⁺ bzw. CD8⁺T-Zellen wurden 21 Tage nach Infektion aus C57BL/6-Mäusen isoliert und zu verschiedenen Infektionszeitpunkten (Tag 45, 55 und 63) in die laterale Schwanzvene *R. typhi*-infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse injiziert. Den infizierten Kontrollmäusen wurde PBS anstelle von T-Zellen verabreicht.

4 Ergebnisse

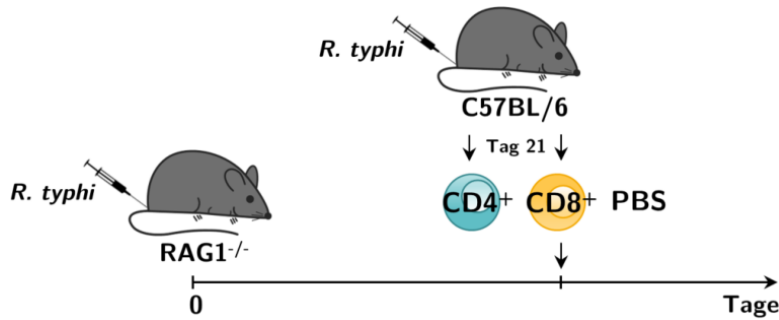


Abbildung 4.7: Adoptiver T-Zelltransfer in *R. typhi*-infizierte C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse. C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse wurden mit 1×10^8 *R. typhi* (s.c.) infiziert. CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen wurden 21 Tage nach Infektion aus der Milz von C57BL/6-Mäusen isoliert. Die gereinigten T-Zellen wurden den *R. typhi*-infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten (Tag 45, 55, 63) intravenös injiziert (1×10^6 Zellen/Maus). Kontrollmäuse erhielten PBS anstelle von T-Zellen.

Zunächst wurden T-Zellen 45 bzw. 55 Tage nach *R. typhi*-Infektion in C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse transferiert. Beide Experimente führten zum gleichen Resultat, daher wird beispielhaft nur das Ergebnis von dem Transfer gezeigt, der 55 Tage nach der Infektion durchgeführt wurde (Abb. 4.8). Um zu prüfen, ob der T-Zelltransfer erfolgreich war, wurde der Anteil CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Blut 7 Tage nach Injektion durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.8 A). In allen C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen konnte die entsprechend injizierte T-Zellsubpopulation im Blut nachgewiesen werden, wobei die T-Zellfrequenzen zwischen den einzelnen Individuen stark variierten. Nach dem Transfer von CD4⁺ T-Zellen machten diese $15,9 \pm 12,1$ % der Leukozytenpopulation aus. CD8⁺ T-Zellen ließen sich in diesen Mäusen nicht nachweisen. Der Anteil an CD8⁺ T-Zellen lag im Blut der CD8⁺ T-Zellrezipienten bei $17,8 \pm 11,3$ %. Die gemittelte T-Zellfrequenz nach CD4⁺ und CD8⁺ T-Zelltransfer war demnach vergleichbar hoch. Die *R. typhi*-infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 150 Tagen beobachtet und ihr Gesundheitszustand engmaschig dokumentiert (Abb. 4.8 B). Alle C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse, die T-Zellen erhalten hatten, überlebten die *R. typhi*-Infektion. Bei einigen CD4⁺ T-Zellrezipienten kam es im Infektionsverlauf zu einer Gewichtsreduktion, die zu einem leichten Anstieg des klinischen Scores führte. Motorische oder neurologische Auffälligkeiten ließen sich jedoch nach einem T-Zelltransfer nicht beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten 80 % der infizierten Kontrollmäuse starke motorische Einschränkungen sowie Gewichtsverlust und mussten infolgedessen von ihrem Leiden erlöst werden. Diese Daten zeigen deutlich, dass sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse mit einer bereits etablierten Infektion vor einer tödlichen Erkrankung schützen können.

4 Ergebnisse

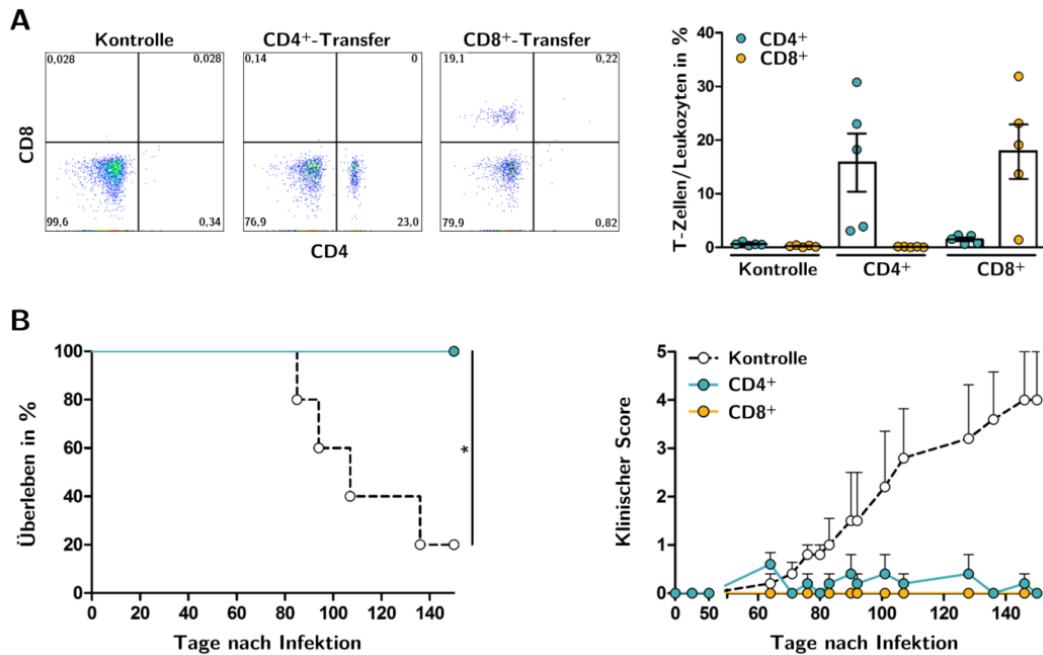


Abbildung 4.8: Sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺T-Zellen schützen C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse vor neurologischer Erkrankung nach *R. typhi*-Infektion. CD4⁺ bzw. CD8⁺T-Zellen wurden 21 Tage nach Infektion aus C57BL/6-Mäusen isoliert. Die gereinigten T-Zellen wurden am 55. Tag nach *R. typhi*-Infektion in C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse transferiert. Infizierte Kontrollmäuse erhielten PBS anstelle von T-Zellen. Die Frequenz der T-Zellen im Blut 7 Tage nach Transfer durchflusszytometrisch analysiert (A). Gezeigt ist exemplarisch eine Färbung der T-Zellen in Dot Plots (links) sowie der prozentuale Anteil an CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen in der Leukozytenpopulation (rechts). Die Überlebensrate (links) sowie der klinische Score (rechts), als Maß für den Gesundheitszustand der Mäuse, wurden im Verlauf der Infektion dokumentiert (B). Dargestellt ist ein Experiment (Mittelwert $\pm$ SEM, n=5). Der statistische Vergleich der Überlebensrate erfolgte mit Log-Rank-Test (* $p < 0,05$).

Im nächsten Experiment wurden immune CD4⁺ bzw. CD8⁺T-Zellen 63 Tage nach Infektion in C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse transferiert - zu einem Zeitpunkt, ab dem die Bakterien im Gehirn nachweisbar sind und expandieren [114]. Die Reinheit der isolierten T-Zellen wurde vor dem Transfer durchflusszytometrisch analysiert und betrug ca. 94 % (Abb. 4.9 A). Der Nachweis der transferierten T-Zellen im Blut der Empfängermäuse erfolgte 7 Tage nach der Injektion mittels Durchflusszytometrie (Abb. 4.9 B). Zu diesem Zeitpunkt ließen sich innerhalb der Leukozytenpopulation $29,3 \pm 8,2$ % CD4⁺T-Zellen in den CD4⁺ T-Zellrezipienten und $22,9 \pm 11,5$ % CD8⁺T-Zellen in den CD8⁺T-Zellrezipienten detektieren. Die jeweils andere T-Zellsubpopulation konnte im Blut nicht nachgewiesen werden. Wie zuvor erhielten infizierte Kontrollmäuse PBS anstelle von T-Zellen. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde über einen Zeitraum von 150 Tagen beurteilt (Abb. 4.9 C). 90 % der Kontrollmäuse erlagen der *R. typhi*-Infektion innerhalb von 120 Tagen. Sie zeigten neurologische Symptome wie Tremor, Koordinationsstörungen und Lähmungserscheinungen, die mit einem deutlichen Gewichtsverlust einhergingen. Bei etwa 40 % der Mäuse, die CD4⁺T-Zellen transferiert bekamen, ließen sich diese Krankheitssymptome im selben Zeitfenster beobachten. Auch diese Mäuse mussten von ihrem Leiden erlöst werden. Die übrigen 60 % blieben asymptomatisch

4 Ergebnisse

und überlebten die *R. typhi*-Infektion. Alle C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse, die 63 Tage nach der Infektion CD8⁺T-Zellen erhalten hatten, zeigten dagegen zu keinem Zeitpunkt Krankheits-symptome und überlebten die Infektion.

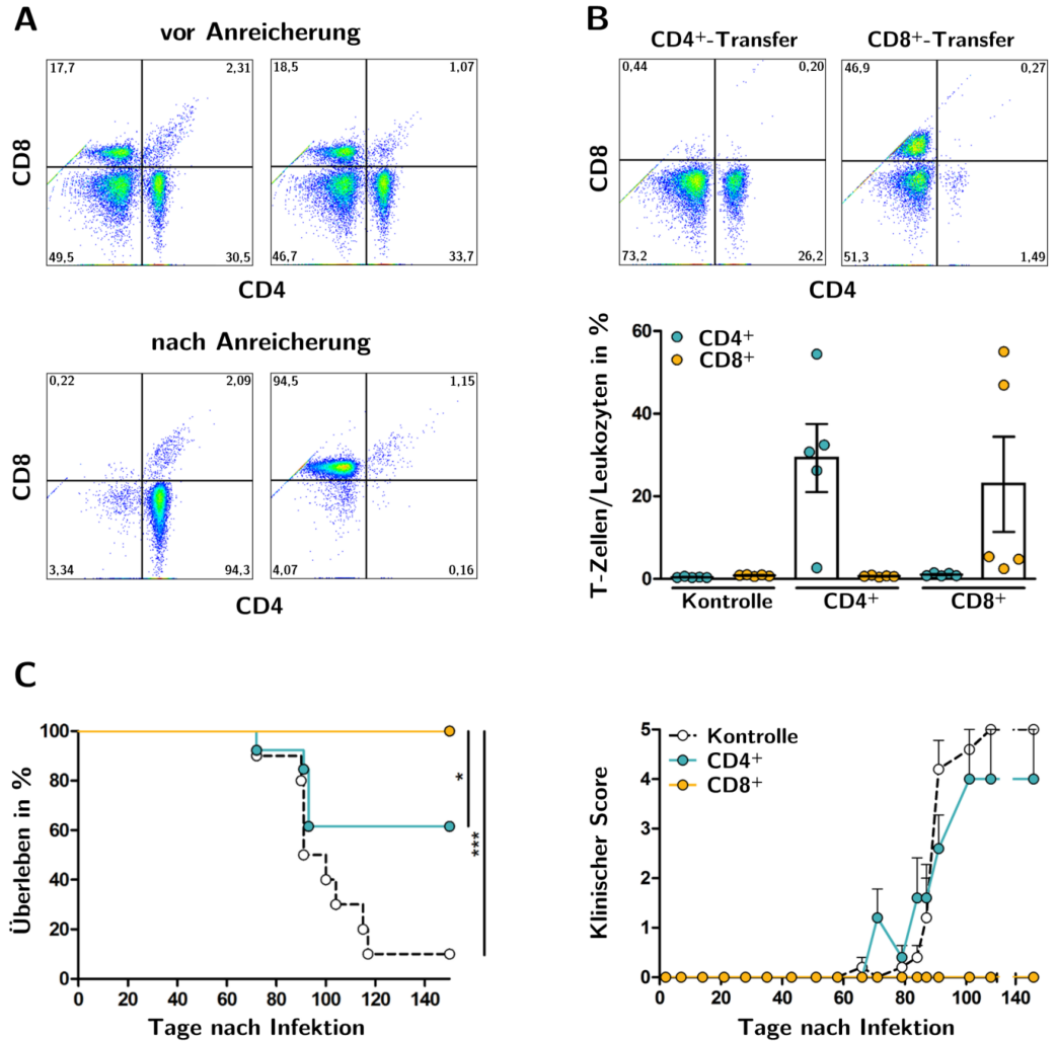


Abbildung 4.9: CD4⁺T-Zellen schützen C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu CD8⁺T-Zellen weniger gut, wenn sie zu einem späten Zeitpunkt der *R. typhi*-Infektion transferiert werden. CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen wurden 21 Tage nach Infektion aus der Milz *R. typhi*-infizierter C57BL/6-Mäuse isoliert. Gezeigt sind Dot Plots der T-Zellfärbung vor und nach magnetischer Zellseparation (A). Die angereicherten Zellen wurden 63 Tage nach Infektion in C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse transferiert. Infizierten Kontrollmäusen wurde PBS anstelle von T-Zellen injiziert. Der Nachweis der T-Zellen erfolgte 7 Tage nach Transfer mittels Durchflusszytometrie (B). Dargestellt sind exemplarische Dot Plots der Färbung von CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen im Blut der Empfänger-mäuse. Das Diagramm zeigt die statistische Auswertung des prozentualen Anteils von CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen in der Leukozytenpopulation der Empfänger- und Kontrollmäuse. Für die Überlebensrate (links) ist eine Kombination aus zwei Experimenten dargestellt (Kontrolle n=10, CD4⁺ n=13, CD8⁺ n=9). Ein repräsentatives Experiment ist für den klinischen Score (rechts) gezeigt (Mittelwert ± SEM, n=5) (C). Der statistische Vergleich der Überlebensraten erfolgte mit Log-Rank-Test (*p<0,05).

4 Ergebnisse

Zusammengefasst belegen diese Daten, dass nicht nur CD8⁺, sondern auch CD4⁺T-Zellen, vor einer *R. typhi*-bedingten neurologischen Erkrankung schützen. MHCII^{-/-}- bzw. MHCI^{-/-}-Mäuse, die für je eine der beiden T-Zellsubpopulationen defizient sind, besitzen einen 100 %igen Schutz. Auch ein Transfer von CD8⁺ oder CD4⁺T-Zellen in C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse kann das Auftreten motorischer und neurologischer Störungen nach *R. typhi*-Infektion verhindern. Während ein Transfer von CD8⁺T-Zellen unabhängig vom Transferzeitpunkt schützt, sind CD4⁺T-Zellen weniger effektiv, wenn sie zu einem Zeitpunkt transferiert werden, an dem die Infektion bereits deutlich fortgeschritten ist.

4.1.3 CD4⁺T-Zellen eliminieren *R. typhi* weniger effizient

Zur weiteren Analyse des T-Zell-vermittelten Schutzes nach Transfer wurde die Bakterienlast in den verschiedenen Organen der Empfängermäuse unter Verwendung einer *R. typhi*-spezifischen qPCR bestimmt [170]. Diese und alle weiteren Untersuchungen erfolgten in C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen, die CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen am 63. Tag nach *R. typhi*-Infektion erhalten hatten. Der Nachweis der Bakterien wurde 7 Tage nach T-Zelltransfer bzw. PBS-Injektion durchgeführt (Abb. 4.10 A). Des Weiteren wurde die Erregerlast zum Todeszeitpunkt in den Kontrollmäusen sowie Empfängermäusen bestimmt, die eine Infektion trotz Transfer von CD4⁺T-Zellen nicht überlebten. Organe von Mäusen, die nach dem T-Zelltransfer asymptomatisch blieben, wurden 210 Tage nach Infektion entnommen und analysiert (Abb. 4.10 B). Wie bereits aus früheren Studien bekannt ist, lässt sich bei *R. typhi*-infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen die höchste Erregerlast im Gehirn nachweisen [114]. Dementsprechend konnten im Gehirn der infizierten Kontrollmäuse 70 Tage nach Infektion bereits 2×10^2 *R. typhi*-Kopien pro 20ng DNA detektiert werden, während die Bakterienlast in Rückenmark, Lunge und Milz wesentlich geringer und in der Leber kaum nachweisbar war (Abb. 4.10, A). In *R. typhi*-infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen, die CD8⁺T-Zellen injiziert bekamen, konnte im Vergleich zur Kontrolle bereits 7 Tage nach Transfer eine signifikante Reduktion der Erregerlast im Gehirn, Rückenmark und in der Lunge beobachtet werden (Abb. 4.10 A). Überhaupt ließ sich *R. typhi* in den ausgewählten Organen bei nur noch 40 % der CD8⁺T-Zellrezipienten in geringer Anzahl detektieren. Ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Unterschied bezüglich der Bakterienlast konnte ebenfalls zwischen der Kontrolle und den Mäusen festgestellt werden, die CD4⁺T-Zellen erhalten hatten. Eine verringerte Erregerlast zeigte sich auch hier, 7 Tage nach T-Zelltransfer, in Gehirn, Rückenmark und Lunge. Auf die ohnehin geringe Bakterienlast in der Milz hatte die Gegenwart von CD4⁺T-Zellen keine Auswirkungen.

4 Ergebnisse

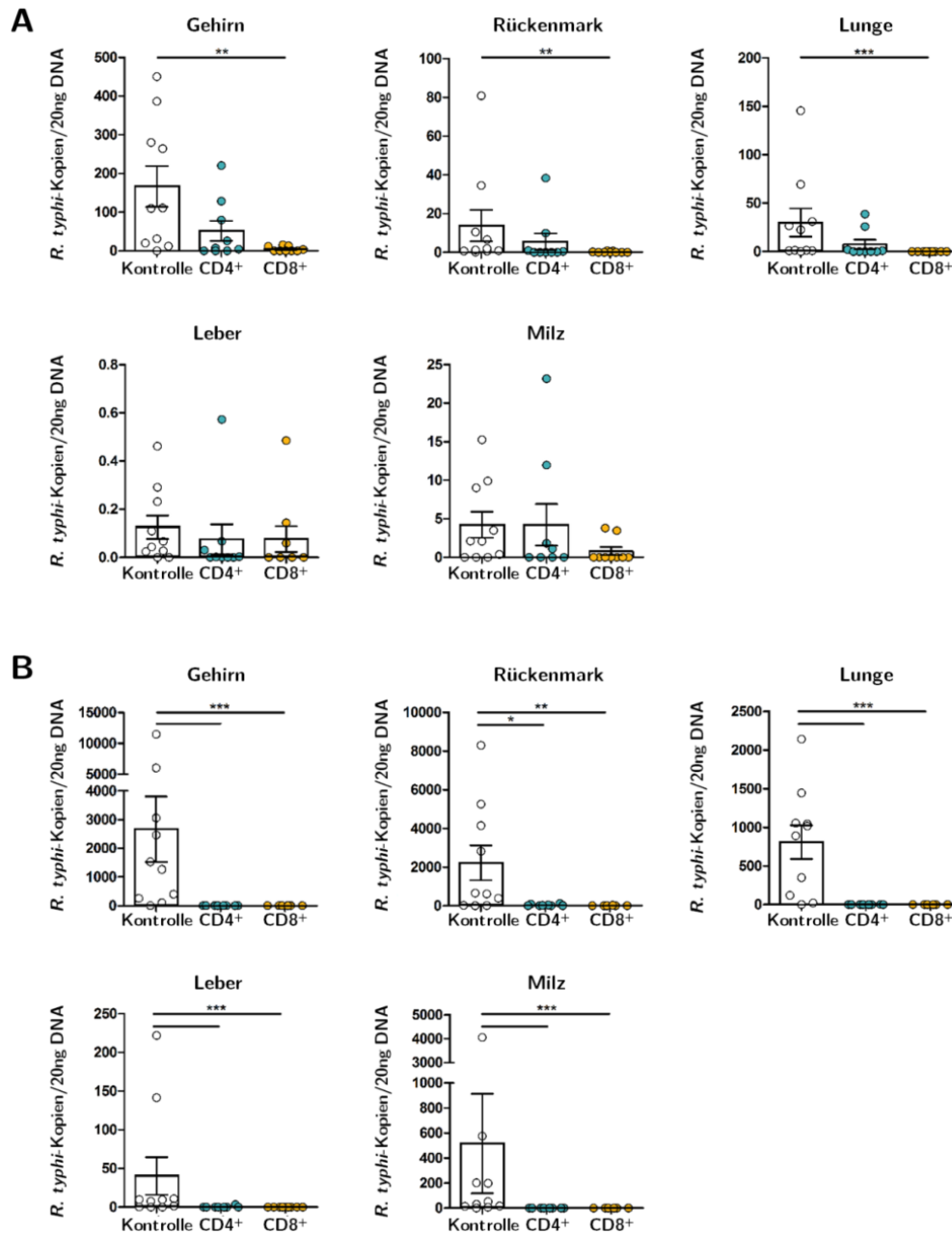


Abbildung 4.10: Im Vergleich zu CD8⁺T-Zellen eliminieren CD4⁺T-Zellen *R. typhi* weniger effizient. Die Bakterienlast wurde 7 Tage nach T-Zelltransfer (A) sowie zum Todeszeitpunkt bzw. zum Ende des Experiments (Tag 210 nach Infektion) (B) in Gehirn, Rückenmark, Lunge, Leber und Milz der infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse bestimmt. Der Nachweis erfolgte mit einer *R. typhi*-spezifischen qPCR. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente (Mittelwert $\pm$ SEM, n= 10-12). Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

Zum Zeitpunkt des Todes konnte in den analysierten Organen der Kontrollmäuse eine deutliche Zunahme der Bakterienlast im Vergleich zum 70. Tag nach Infektion verzeichnet werden (4.10 B). Im Gegensatz dazu ließ sich *R. typhi* in 60 % der Mäuse, die CD8⁺T-Zellen erhal-

ten hatten, 210 Tage nach der Infektion nicht mehr nachweisen. In den restlichen CD8⁺T-Zellrezipienten war *R. typhi* in geringer Anzahl ausschließlich im Gehirn und Rückenmark detektierbar. Eine signifikant geringere Bakterienlast im Vergleich zur Kontrolle konnte auch bei den Mäusen festgestellt werden, die CD4⁺T-Zellen transferiert bekamen. Überraschenderweise ließ sich eine reduzierte Erregerlast hier nicht nur in den überlebenden Mäusen beobachten. In den Organen der 5 Mäuse, die der Infektion trotz T-Zelltransfers erlagen, war *R. typhi* ebenfalls nicht mehr detektierbar. Am Ende des Experiments konnten in 6 der 7 überlebenden CD4⁺T-Zellrezipienten Bakterien im Rückenmark nachgewiesen werden. Drei der Mäuse wiesen zudem eine geringe Bakterienlast im Gehirn und eine in Lunge und Leber auf. Symptome wurden jedoch bei keiner der überlebenden Empfängermäuse beobachtet. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass immune CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen in der Lage sind, *R. typhi* zu beseitigen. Im Vergleich zu CD4⁺T-Zellen eliminieren CD8⁺T-Zellen die Bakterien jedoch schneller und effizienter. Beide Subpopulationen können eine *R. typhi*-Infektion kontrollieren und das Auftreten der Erkrankung verhindern.

4.1.4 C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse weisen nach CD4⁺T-Zelltransfer erhöhte IFN γ - und TNF α -Konzentrationen im Serum auf

Um Hinweise auf die Aktivität der transferierten T-Zellen zu erhalten, wurde die Serum-Zytokin-Konzentration 7 Tage nach T-Zelltransfer bzw. PBS-Injektion in den infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen analysiert (Abb. 4.11). Die Quantifizierung der Zytokine erfolgte unter Verwendung eines Bead-basierten Immunassays, der die Messung von 13 verschiedenen Analyten gleichzeitig erlaubt. Im Serum der Mäuse waren IFN γ , TNF α und IL-6 am 70. Tag nach Infektion die einzigen messbaren Zytokine. Im Vergleich zu den Kontrollmäusen ($413,2 \pm 132,2$ pg/ml) konnte in Mäusen, die CD4⁺T-Zellen erhalten hatten, eine erhöhte IFN γ -Konzentration ($1857,1 \pm 928,1$ pg/ml) nachgewiesen werden. Zudem ließ sich in CD4⁺T-Zellrezipienten gegenüber Kontrollmäusen ($7,0 \pm 0,7$ pg/ml) eine signifikant gesteigerte TNF α -Synthese ($17,0 \pm 4,6$ pg/ml) detektieren. Typische T_H2- (IL-4, IL-10, IL-13) oder T_H17-Zytokine (IL17A/F) waren hingegen nicht messbar. Der Serumspiegel von IFN γ und TNF α ähnelte nach CD8⁺T-Zelltransfer dem der Kontrollmäuse. Die IL-6-Konzentration war im Serum dieser Mäuse ($3,7 \pm 0,9$ pg/ml) jedoch deutlich geringer als bei den Kontrollmäusen ($14,4 \pm 4,3$ pg/ml).

Diese Daten zeigen, dass aktivierte CD4⁺T-Zellen, nicht aber CD8⁺T-Zellen, *in vivo* IFN γ und TNF α freisetzen und demnach ein T_H1-Profil aufweisen.

4 Ergebnisse

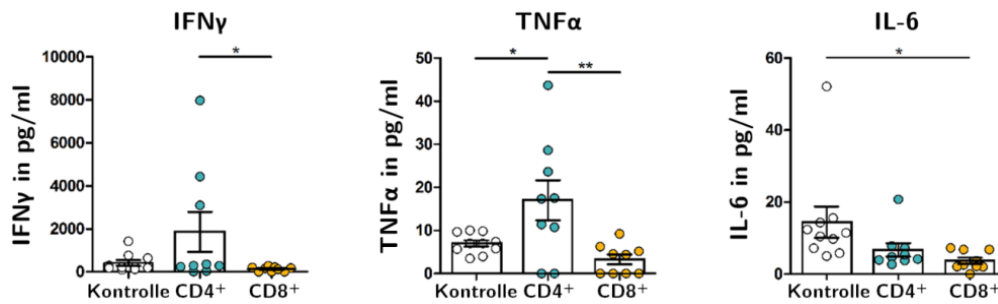


Abbildung 4.11: Im Serum *R. typhi*-infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse lässt sich nach Transfer von CD4⁺T-Zellen ein TH1-Zytokin-Profil nachweisen. Zytokinkonzentrationen wurden 7 Tage nach T-Zelltransfer bzw. PBS-Injektion (Kontrolle) im Serum *R. typhi*-infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse gemessen. Der Nachweis der Zytokine erfolgte mithilfe eines Bead-basierten Immunassays. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente (Mittelwert $\pm$ SEM, n=10). Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* p <0,05, ** p <0,01).

4.1.5 CD4⁺T Zellen steigern die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen und Mikroglia im ZNS von *R. typhi*-infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen

Nach *R. typhi*-Infektion lässt sich in C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen die höchste Erregerlast im Gehirn und Rückenmark nachweisen. Hier ruft *R. typhi* Entzündungsreaktionen hervor, die durch die Expansion von Mikroglia sowie die Infiltration von iNOS-exprimierenden Makrophagen gekennzeichnet sind [114]. Im Folgenden wurde untersucht, wie dies durch den Transfer von CD4⁺ bzw. CD8⁺T-Zellen beeinflusst wird. Dafür wurde zunächst durchflusszytometrisch analysiert, ob sich 7 Tage nach Transfer T-Zellen im Gehirn nachweisen lassen. Anhand der Expression von CD45 lassen sich infiltrierte, CD45 hoch exprimierende Immunzellen, von den im Gehirn ansässigen CD45 schwach exprimierenden Immunzellen unterscheiden. Immunzellinfiltrate konnten im Gehirn von nicht infizierten C57BL/6- und C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen, die als zusätzliche Kontrolle dienten, kaum nachgewiesen werden (Abb. 4.12 A). Im Gegensatz dazu waren infiltrierte Immunzellen in allen *R. typhi*-infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen deutlich erkennbar.

Neben CD45 wurden die Gehirnzellen auch gegen CD4 und CD8 gefärbt, um infiltrierte T-Zellen zu detektieren. Nach CD4⁺T-Zelltransfer waren CD4⁺T-Zellen im Gehirn aller Mäuse nachweisbar und machten mit $35,4 \pm 8,6$ % einen hohen Anteil der infiltrierte Immunzellen aus (Abb. 4.12 B). CD8⁺T-Zellen waren im ZNS dieser Mäuse erwartungsgemäß nicht vorhanden. Im Gehirn der Mäuse, die CD8⁺T-Zellen erhalten hatten, konnten diese 7 Tage nach Transfer in lediglich 2 der 5 Empfängertiere detektiert werden (Abb. 4.12 C). Diese Mäuse wiesen mit $60,4 \pm 1,0$ % CD8⁺T-Zellen einen sehr hohen T-Zellanteil unter den infiltrierte Immunzellen auf. CD4⁺T-Zellen waren in diesen Tieren nicht nachweisbar. Die transferierten T-Zellen passieren demnach die Blut-Hirn-Schranke und wandern in das ZNS der *R. typhi*-infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse.

4 Ergebnisse

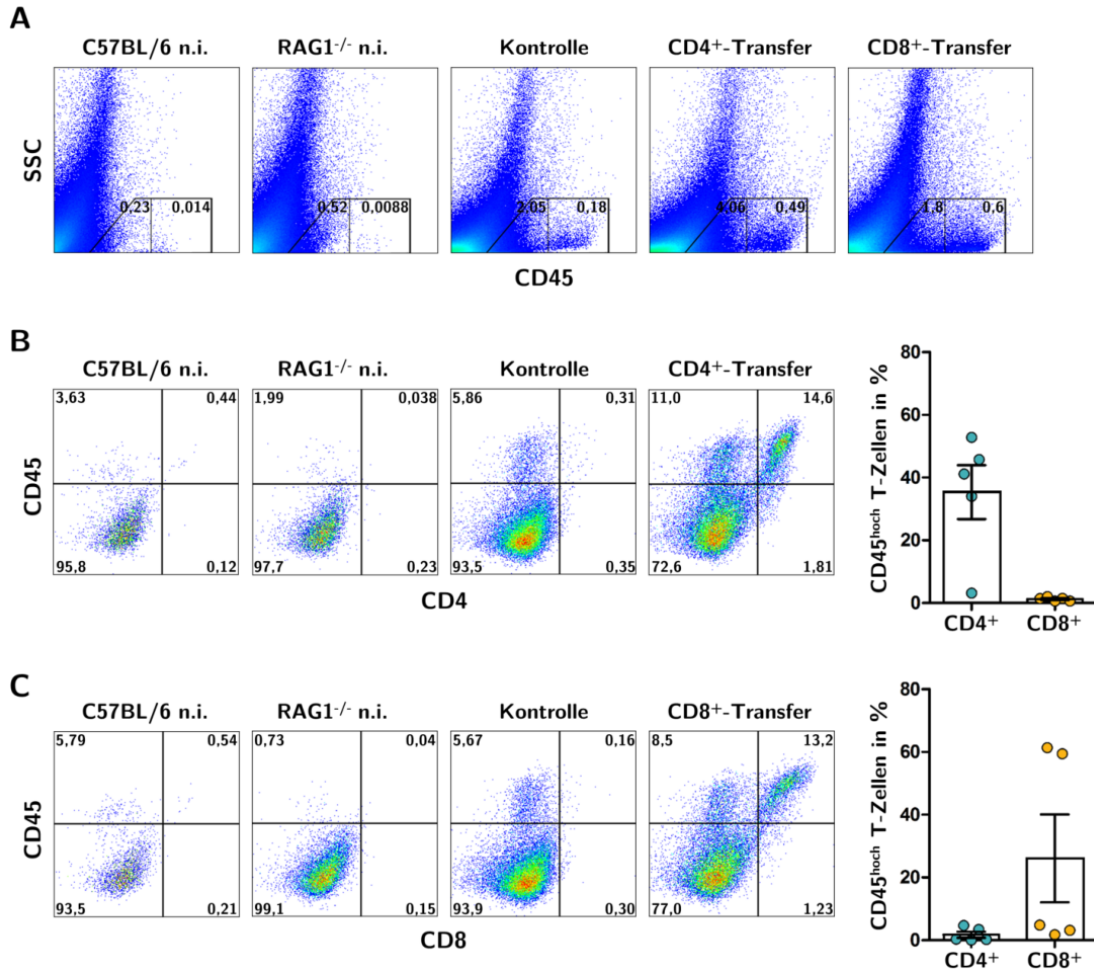


Abbildung 4.12: Nach T-Zelltransfer gelangen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in das Gehirn *R. typhi*-infizierter C57BL/6 $RAG1^{-/-}$ -Mäuse. Der Nachweis von T-Zellen im Gehirn erfolgte 7 Tage nach Transfer (Tag 70 nach *R. typhi*-Infektion) mittels Durchflusszytometrie. Anhand der Expression von CD45 wurden infiltrierte Immunzellen ($CD45^{hoch}$) von den im Gehirn ansässigen ($CD45^{niedrig}$) unterschieden (A). Repräsentative Dot Plots (links) zeigen die Färbung von $CD4^+$ (B) bzw. $CD8^+$ T-Zellen (C) im Gehirn nicht infizierter C57BL/6- und C57BL/6 $RAG1^{-/-}$ -Mäuse, *R. typhi*-infizierter Kontrollen sowie im Gehirn von Mäusen nach T-Zelltransfer. Graphisch dargestellt ist der Anteil an $CD4^+$ (B) und $CD8^+$ T-Zellen (C) unter den infiltrierten Immunzellen (rechts). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Dargestellt ist ein Experiment (Mittelwert $\pm$ SEM, $n=5$). Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test.

Um zu klären, ob die Anwesenheit der T-Zellen einen Einfluss auf die Anzahl und den Aktivierungszustand infilrierter Makrophagen oder residenter Mikroglia hat, erfolgten weitere durchflusszytometrische Analysen, bei denen neben CD45 auch CD11b gefärbt wurde (Abb. 4.13). Auf diese Weise können Mikroglia ($CD45^{niedrig} CD11b^+$) und Makrophagen ($CD45^{hoch} CD11b^+$) von anderen Immunzellen unterschieden werden. Wie erwartet, war die Anzahl infilrierter Makrophagen im Gehirn *R. typhi*-infizierter C57BL/6 $RAG1^{-/-}$ -Mäuse ($3164,5 \pm 425,3 / 10^6$ Zellen) im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren ($56,2 \pm 14,9 / 10^6$ Zellen) deutlich erhöht (Abb.4.13 A). Eingewanderte Makrophagen konnten auch im Gehirn der Mäuse

4 Ergebnisse

detektiert werden, die 7 Tage zuvor CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen erhalten hatten. Die größte Anzahl an Makrophagen ($5125,6 \pm 953,2 / 10^6$ Zellen) ließ sich nach dem Transfer von CD4⁺T-Zellen beobachten. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren jedoch nicht ersichtlich. Hinweise auf den Aktivierungszustand der Zellen lieferte die Expressionsanalyse von iNOS. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von NO, welches, zusammen mit seinem Folgeprodukt Peroxynitrit, an der Abtötung intrazellulärer Pathogene beteiligt ist [182]. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ein großer Anteil der, in das Gehirn *R. typhi*-infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse, migrierten Makrophagen, iNOS exprimiert [114]. Ein Unterschied hinsichtlich der iNOS-Expression in Makrophagen von nicht infizierten ($5,2 \pm 1,6$ %) und infizierten Mäusen ($12,5 \pm 1,6$ %) war auch in diesen Experimenten erkennbar (Abb.4.13 A). Dieser fiel jedoch bedeutend geringer aus, da die Analyse hier nicht zum Todeszeitpunkt, sondern bereits 70 Tage nach Infektion erfolgte. Aktivierte Makrophagen konnten ebenfalls im Gehirn von Mäusen nachgewiesen werden, die CD8⁺T-Zellen transferiert bekamen ($15,4 \pm 3,8$ %). Die Frequenz der iNOS-exprimierenden Makrophagen war hier vergleichbar mit der in den infizierten Kontrollen. Im Gegensatz dazu ließ sich in Mäusen, die CD4⁺T-Zellen erhalten hatten, ein signifikanter Anstieg iNOS-exprimierender Makrophagen detektieren ($42,8 \pm 6,1$ %). Der Anteil aktivierter Makrophagen im Gehirn dieser Mäuse war verglichen mit der infizierten Kontrolle mehr als 3-mal so hoch.

Die Analyse von Anzahl und Aktivität der residenten Mikroglia nach T-Zelltransfer ergab ein ähnliches Bild (Abb. 4.13, B). Die Infektion mit *R. typhi* führte zu einer Expansion dieser Zellen. Gegenüber nicht infizierten Kontrollen ($903,7 \pm 282,5 / 10^6$ Zellen) wiesen infizierte Mäuse ($4714,1 \pm 274,5 / 10^6$ Zellen) eine deutlich höhere Anzahl an Mikroglia im Gehirn auf. Wie bereits bei den Makrophagen beobachtet, war auch die Anzahl der Mikroglia im Gehirn von Mäusen, die CD4⁺T-Zellen erhalten hatten, tendenziell erhöht ($5987,4 \pm 896,2 / 10^6$ Zellen). Im Gehirn der CD8⁺T-Zellrezipienten ($2762,4 \pm 618,7 / 10^6$ Zellen) ließ sich hingegen eine geringere Expansion der Mikroglia nachweisen. Die Expression von iNOS ist in Mikroglia von *R. typhi*-infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen normalerweise kaum detektierbar [114]. Entsprechend niedrig war der prozentuale Anteil an iNOS⁺Mikroglia in den infizierten Kontrolltieren ($1,4 \pm 0,4$ %). Durch die Anwesenheit von CD4⁺T-Zellen erhöhte sich der Anteil iNOS-exprimierender Mikroglia um das 2fache ($4,2 \pm 0,9$ %). Der Transfer von CD8⁺T-Zellen hatte hingegen keinen nachweisbaren Einfluss auf die iNOS-Produktion der Mikroglia ($1,6 \pm 0,4$ %). Zusätzlich zur Durchflusszytometrie erfolgten immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis iNOS-exprimierender Zellen im Gehirn. Abbildung 4.14 zeigt repräsentative Übersichtsfärbungen von iNOS im Gehirn einer *R. typhi*-infizierten Kontrollmaus sowie von Mäusen, die CD4⁺ bzw. CD8⁺T-Zellen erhalten hatten. Zusätzlich zu iNOS wurde IBA1, ein Marker für Makrophagen und Mikroglia im Gehirn [183, 184], sowie CD3 für den Nachweis von T-Zellen gefärbt. Eine erhöhtes Vorkommen iNOS-exprimierender Zellen ließ sich auch hier ausschließlich nach Transfer von CD4⁺T-Zellen nachweisen. Die iNOS-Produzenten wa-

4 Ergebnisse

ren dabei vorwiegend an der Grenze zwischen Hirnventrikel und -gewebe sowie an der inneren Hirnhaut, der *Pia mater* lokalisiert. Im Gehirn der infizierten Kontrollmäuse und der Mäuse, die CD8⁺T-Zellen transferiert bekamen, wurden hingegen nur wenige iNOS-exprimierende Zellen registriert. T-Zellen waren bei den infizierten Empfängermäusen vornehmlich im Bereich der Hirnventrikelwände, aber auch im Parenchym detektierbar (Abb. 4.15). In unmittelbarer Umgebung der infiltrierten T-Zellen waren Ansammlungen von IBA1⁺ Makrophagen oder Mikroglia zu beobachten. Eine Vielzahl der IBA1⁺Zellen, die mit CD4⁺T-Zellen kolokalisierten, exprimierten iNOS. Im Gegensatz dazu ließen sich iNOS-produzierende IBA1⁺Zellen im Gehirn der Mäuse, die CD8⁺T-Zellen erhalten hatten, kaum nachweisen.

Ähnliche Beobachtungen wurden zu diesem Zeitpunkt der Infektion auch im Rückenmark gemacht. Während sich iNOS-exprimierende Zellen im Rückenmark der infizierten Kontrollmäuse und der Mäuse nach CD8⁺ T-Zelltransfer kaum nachweisen ließen, waren infiltrierte CD4⁺T-Zellen umgeben von iNOS-produzierenden IBA1⁺ Zellen [139].

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass CD4⁺T-Zellen im ZNS *R. typhi*-infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse die iNOS-Expression in Makrophagen und Mikroglia induzieren. CD4⁺T-Zellen steigern somit die antimikrobielle Aktivität dieser Zellen, fördern aber auch entzündliche Reaktionen im Gehirn und Rückenmark.

4 Ergebnisse

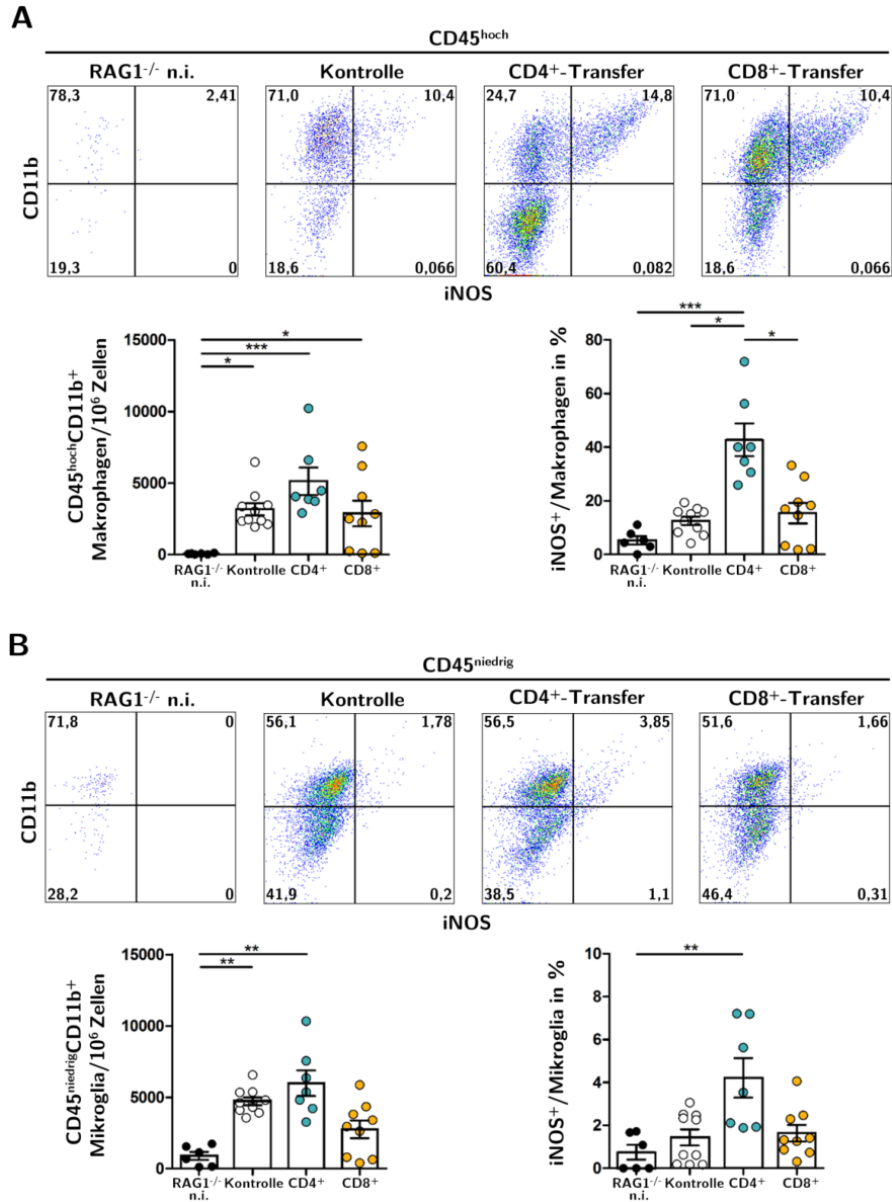


Abbildung 4.13: CD4⁺T-Zellen induzieren im Gehirn *R. typhi*-infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse die Expression von iNOS in Makrophagen und Mikroglia. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Anzahl infiltrierter Makrophagen (CD45^{hoch}CD11b⁺) und residenter Mikroglia (CD45^{niedrig}CD11b⁺) sowie der Anteil an iNOS-Produzenten unter diesen Zellen im Gehirn *R. typhi*-infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse analysiert. Die Untersuchung erfolgte 7 Tage nach T-Zelltransfer bzw. Injektion von PBS (Kontrolle). Naive C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse dienten als zusätzliche Kontrolle. Graphisch dargestellt ist die Anzahl an Makrophagen (**A**) bzw. Mikroglia (**B**) unter 1 x 10⁶ analysierten Zellen. Exemplarische Färbungen der iNOS-exprimierenden Makrophagen (**A**) und Mikroglia (**B**) sind in Dot Plots (oben), die dazugehörigen Auswertungen in Balkendiagrammen (unten) gezeigt. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente (Mittelwert ± SEM, n=10). Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (**p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001).

4 Ergebnisse

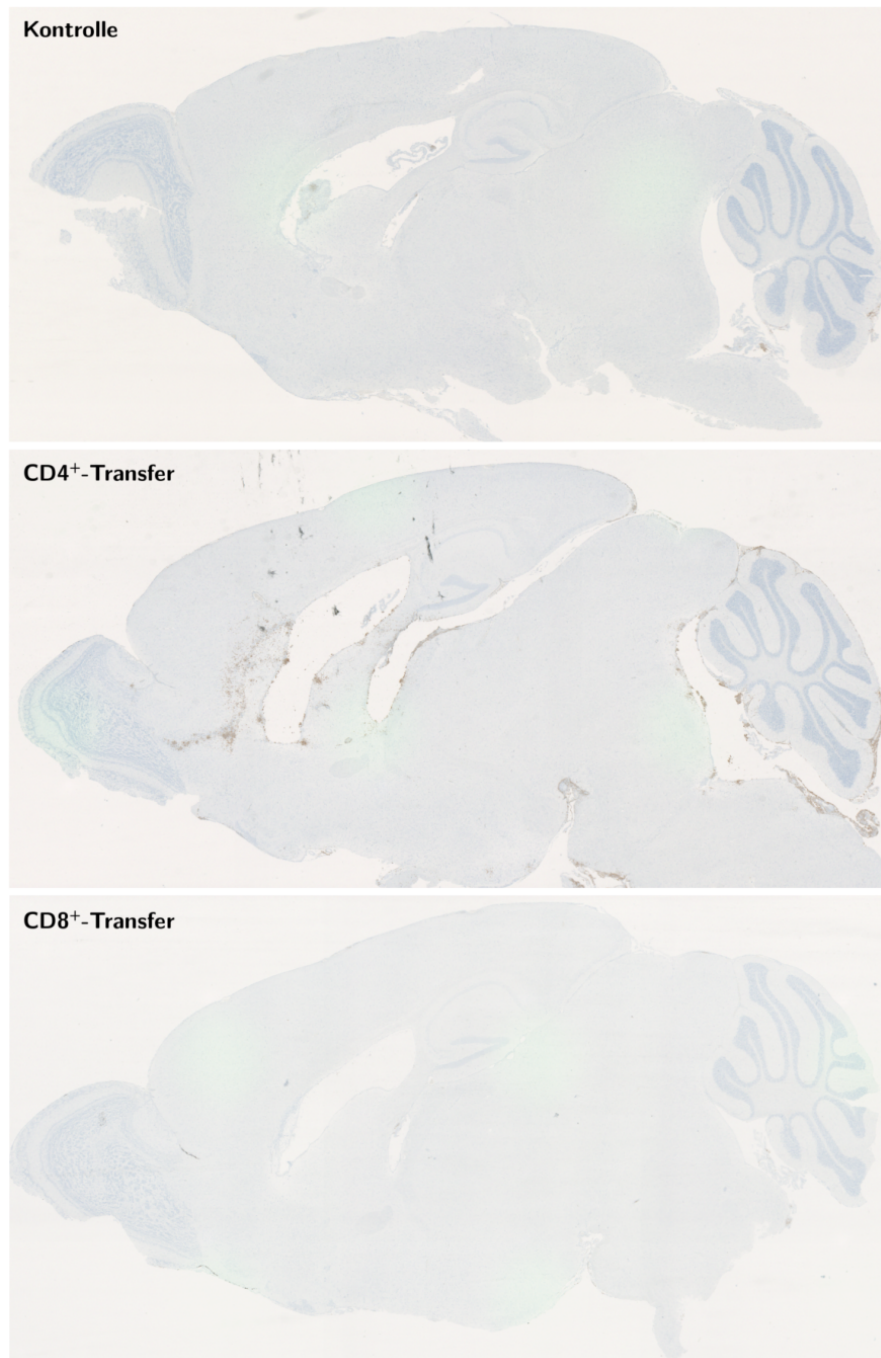


Abbildung 4.14: Immunhistochemischer Nachweis iNOS-exprimierender Zellen im Gehirn *R. typhi*-infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse nach T-Zelltransfer. Die Expression von iNOS im Gehirn *R. typhi*-infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse wurde 7 Tage nach T-Zelltransfer bzw. PBS-Injektion immunhistochemisch analysiert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der iNOS-Färbung sagittaler Gehirnschnitte in 2facher Vergrößerung. Im Gehirn der Kontrollen sowie der Mäuse, die CD8⁺T-Zellen erhalten hatten, ließen sich zu diesem Zeitpunkt kaum iNOS-exprimierende Zellen nachweisen. Nach Transfer von CD4⁺T-Zellen waren Akkumulationen iNOS-produzierender Zellen deutlich erkennbar. Diese befanden sich vor allem im Bereich der Hirnventrikelwände und der *Pia mater*.

4 Ergebnisse

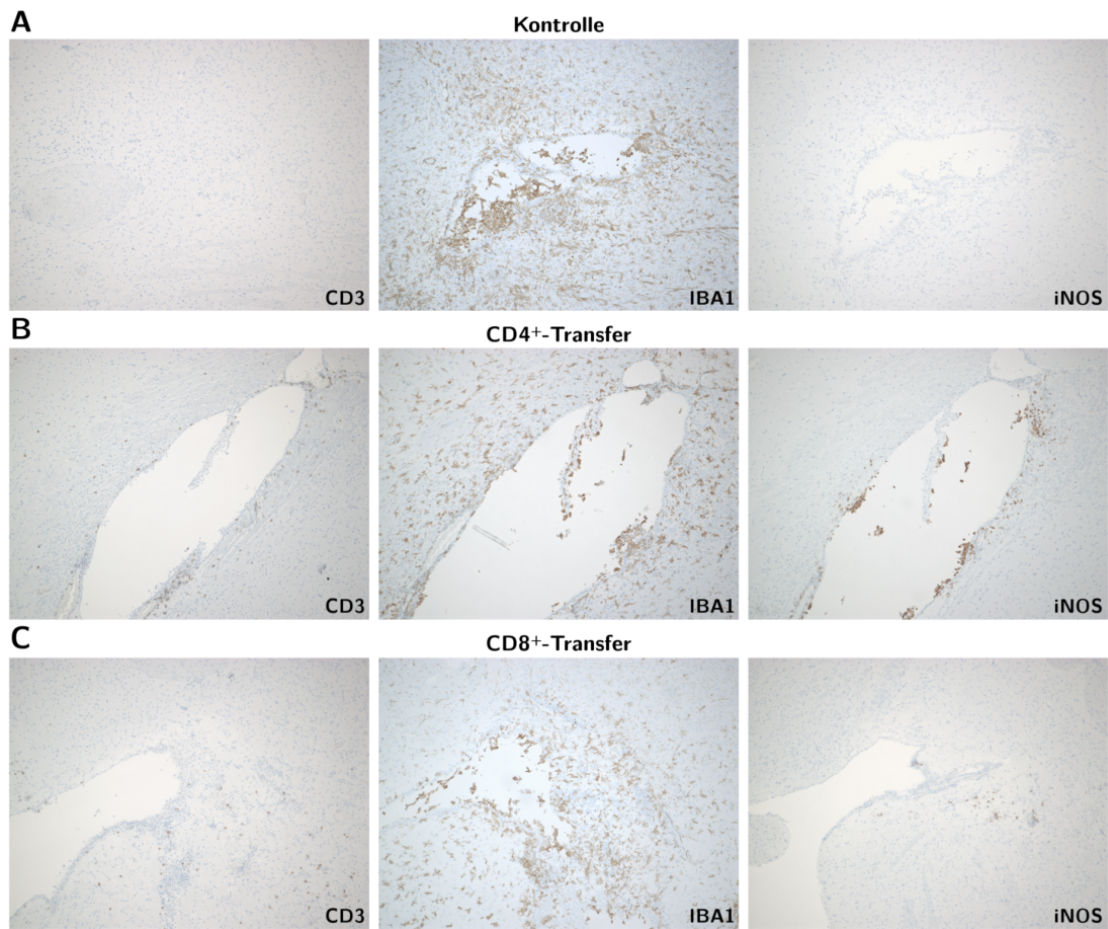


Abbildung 4.15: Immunhistochemische Färbung von T-Zellen, Makrophagen und Mikroglia sowie iNOS im Gehirn *R. typhi*-infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse nach T-Zelltransfer. Infiltrierte T-Zellen (CD3), Makrophagen und Mikroglia (IBA1) sowie iNOS wurden 7 Tage nach T-Zelltransfer bzw. PBS-Injektion (Kontrolle) im Gehirn *R. typhi*-infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse immunhistochemisch detektiert. Gezeigt sind Detailaufnahmen repräsentativer Färbungen sagittaler Gehirnschnitte einer *R. typhi*-infizierten Kontrollmaus (A) sowie von Mäusen, die CD4⁺ (B) oder CD8⁺T-Zellen (C) erhalten hatten.

4.1.6 Immune CD4⁺T-Zellen fördern die Eliminierung von *R. typhi* in Makrophagen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass CD4⁺T-Zellen während einer *R. typhi*-Infektion vermehrt IFN γ synthetisieren und die bakterizide Aktivität von Makrophagen *in vivo* steigern. Im Folgenden sollte nun der direkte Einfluss immuner CD4⁺T-Zellen auf die Bakterienlast *R. typhi*-infizierter Makrophagen sowie die Bedeutung von IFN γ für die Eliminierung der Bakterien *in vitro* analysiert werden. Hierfür wurden *R. typhi*-infizierte Knochenmarkmakrophagen mit gereinigten CD4⁺T-Zellen aus naiven oder immunen C57BL/6-Mäusen kultiviert. Bei einem Teil der Ansätze erfolgte zusätzlich die Neutralisation von IFN γ , um die Bedeutung dieses Zytokins für die Eliminierung von *R. typhi* zu ermitteln. Zudem wurde in den Überständen der Kokulturen 96 Stunden nach Infektion der Makrophagen sowohl die Zytokin- als auch die NO-Konzentration bestimmt (Abb. 4.16 A, B). Der Nachweis der Bakterienlast in den Zellen erfolgte mittels qPCR (Abb. 4.16 C). Nach Kokultivierung naiver CD4⁺T-Zellen mit *R. typhi*-infizierten Makrophagen konnten keine erhöhten Zytokinkonzentrationen im Überstand festgestellt werden. Zudem führte die Anwesenheit naiver CD4⁺T-Zellen nicht zur Freisetzung des bakterizid wirkenden NO. Im Gegensatz dazu wurden in Kokulturen mit immunen CD4⁺T-Zellen hohe Konzentrationen von IFN γ ($20017,4 \pm 5188,3$ pg/ml) und IL-2 ($1210,0 \pm 107,3$ pg/ml) detektiert. Des Weiteren waren in diesen Überständen geringe Konzentrationen TNF α ($73,2 \pm 24,9$ pg/ml), IL-6 ($9,8 \pm 5,9$ pg/ml), IL-10 ($261,5 \pm 35,7$ pg/ml) und NO ($3,9 \pm 2,0$ μ M) nachweisbar. Aufgrund der hohen IFN γ -Konzentration in Kokulturen mit immunen CD4⁺T-Zellen wurde keine vollständige Neutralisation dieses Zytokins erzielt ($5203,3 \pm 1606,1$ pg/ml). Ein Einfluss der Neutralisation von IFN γ auf die Freisetzung anderer Zytokine oder NO konnte nicht belegt werden. Die Quantifizierung der Bakterienlast in den Makrophagen zeigte eine signifikante Abnahme der Bakterienanzahl in Kokulturen mit immunen (43 ± 27 *R. typhi*-Kopien) im Vergleich zu naiven CD4⁺T-Zellen (50684 ± 35126 Kopien). Die Neutralisation von IFN γ konnte diesen Effekt zumindest teilweise wieder aufheben. Im Vergleich zu unbehandelten Kokulturen mit immunen CD4⁺T-Zellen wurde nach Gabe des neutralisierenden Antikörpers eine 10mal höhere Anzahl an *R. typhi*-Kopien detektiert (451 ± 306 Kopien).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass immune CD4⁺T-Zellen die bakterizide Aktivität von Makrophagen *in vitro* steigern und somit die Eliminierung von *R. typhi* fördern. Dies wird zumindest teilweise durch die Sekretion von IFN γ vermittelt.

4 Ergebnisse

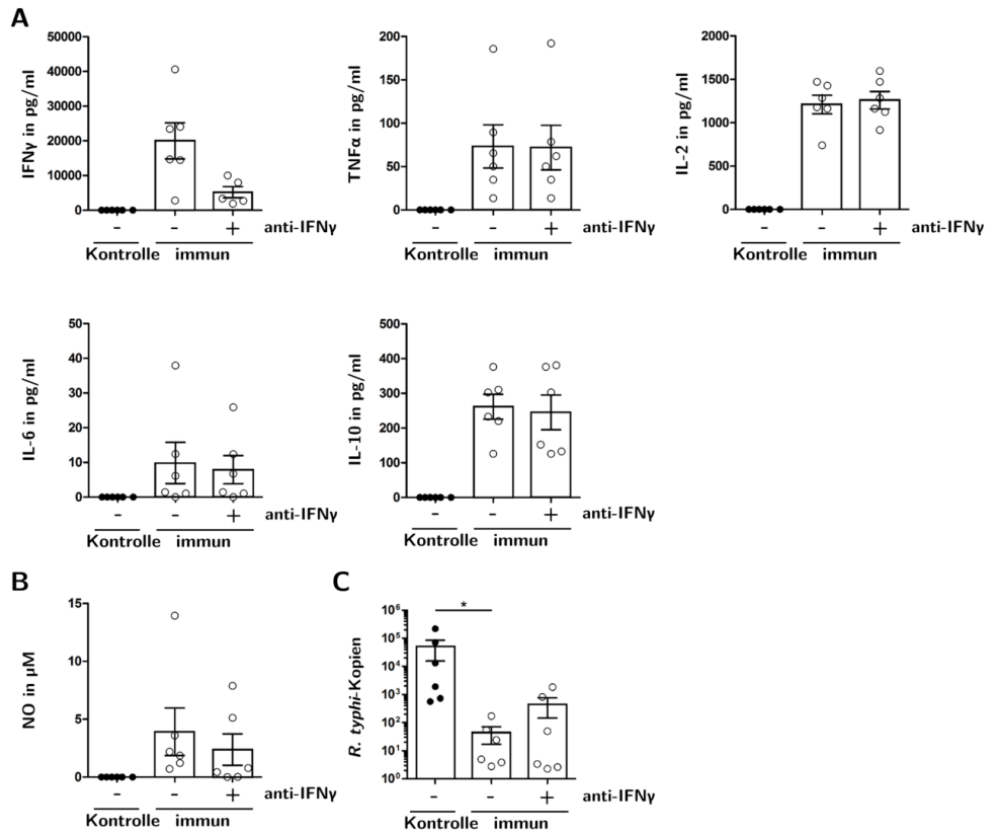


Abbildung 4.16: Immune CD4⁺T-Zellen fördern die Eliminierung von *R. typhi* in Knochenmarkmakrophagen *in vitro*. Knochenmarkmakrophagen wurden mit 5 *R. typhi*-Kopien/Makrophage für 3h inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt. 24h nach der Infektion erfolgte die Zugabe isolierter CD4⁺T-Zellen aus naiven (Kontrolle) oder immunen C57BL/6-Mäusen. In einigen Kokulturen wurde zusätzlich IFN γ neutralisiert. Die Analyse der Zytokin- (A) und NO-Konzentrationen (B) in den Überständen erfolgte 96h nach Infektion der Makrophagen. Die Bakterienlast wurde zum gleichen Zeitpunkt mittels qPCR quantifiziert (C). Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente mit T-Zellen aus je 6 C57BL/6-Mäusen (Mittelwert $\pm$ SEM). Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* p <0,05)

4.2 Bedeutung von CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen für den Schutz von BALB/c-Mäusen gegenüber *R. typhi*

4.2.1 BALB/c-Mäuse generieren im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion eine langanhaltende CD4⁺T_H1- und zytotoxische CD8⁺T-Zell-Antwort

In Folge einer *R. typhi*-Infektion entwickeln BALB/c ebenso wie C57BL/6 Wildtyp-Mäuse keine sichtbaren Krankheitssymptome. Auch hier nehmen adaptive Immunmechanismen eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr der Pathogene ein. So führt eine Infektion mit *R. typhi* bei T- und B-Zell-defizienten CB17 SCID-Mäusen zu einer schwerwiegenden Erkrankung, die innerhalb weniger Wochen tödlich verläuft [115]. Aufgrund des wesentlich kürzeren Krankheitsverlaufs ist dieses Modell besonders geeignet, um den T-Zell-vermittelten Schutz durch adoptive Transferexperimente zu analysieren. Die Verfügbarkeit diverser BALB/c Knockout-Mäuse, die für bestimmte Effektormoleküle defizient sind, sowie neutralisierender Antikörper erlauben darüber hinaus das Studium der für den T-Zell-vermittelten Schutz erforderlichen Voraussetzungen in einem angemessenen Zeitrahmen. Um Erkenntnisse über die Mechanismen des T-Zell-vermittelten Schutzes und mögliche Unterschiede zu C57BL/6-Mäusen zu gewinnen, wurde die T-Zellantwort ebenfalls in *R. typhi*-infizierten BALB/c Wildtyp-Mäusen charakterisiert. Eine Vielzahl von Infektionen geht mit einer Expansion von T-Zellen einher. Daher wurde zunächst untersucht, ob sich während einer Infektion mit *R. typhi* der Anteil an CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen in der Milz verändert. Hierfür wurden Milzzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (Tag 0, 7, 15, 21, 35) isoliert und hinsichtlich der Expression von CD4 und CD8 durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 4.17 zeigt die prozentualen Anteile von CD4⁺ (A) und CD8⁺T-Zellen (B) an der Gesamtlmphozytenpopulation im Verlauf der *R. typhi*-Infektion.

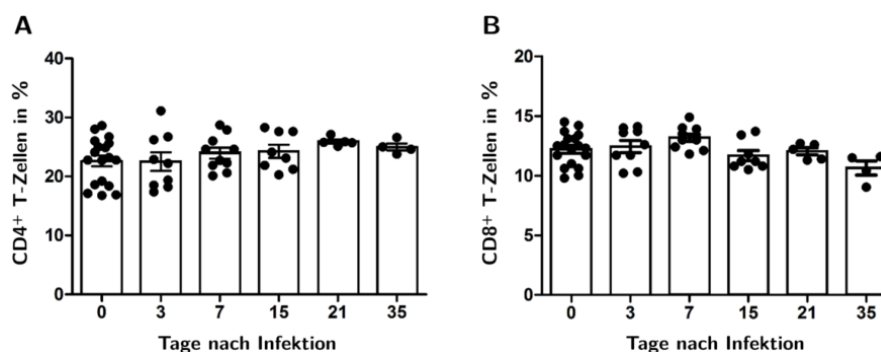


Abbildung 4.17: Prozentualer Anteil an CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen in der Milz von BALB/c-Mäusen im Verlauf der *R. typhi*-Infektion. Milzzellen naiver (Tag 0) und *R. typhi*-infizierter BALB/c-Mäuse wurden zu angegebenen Zeitpunkten nach Infektion isoliert, mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der CD4⁺ (A) und CD8⁺T-Zellen (B) an der Gesamtlmphozytenpopulation (Mittelwert $\pm$ SEM). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test.

4 Ergebnisse

Eine Expansion der untersuchten T-Zellsubpopulationen während der Infektion ließ sich auch in BALB/c-Mäusen nicht nachweisen. Sowohl die absolute Zellzahl (Daten nicht gezeigt) als auch der prozentuale Anteil an CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen blieb im Verlauf der Infektion konstant.

Des Weiteren wurde der Differenzierungsgrad der Zellen näher untersucht. Anhand der Marker CD11a und KLRG1 lassen sich, wie bereits im Abschnitt 4.1.1 erwähnt, naive CD8⁺T-Zellen von Antigen-erfahrenen unterscheiden. Abbildung 4.18 zeigt die Frequenzen CD11a- und KLRG1-exprimierender CD8⁺T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der *R. typhi*-Infektion. Wie in C57BL/6-Mäusen ließ sich auch hier ein signifikanter Anstieg der CD11a-exprimierenden CD8⁺T-Zellen im Infektionsverlauf feststellen (Abb. 4.18 A). Im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe ($6,3 \pm 0,4$ %) konnte bereits 3 Tage nach Infektion ein nahezu doppelt so hoher Anteil aktivierter CD8⁺Effektorzellen ($10,5 \pm 1,0$ %) in der Milz *R. typhi*-infizierter Mäuse detektiert werden. Das Maximum zeigte sich am 7. Tag nach Infektion ($16,6 \pm 0,4$ %). Im weiteren Infektionsverlauf nahm der Anteil CD11a-exprimierender CD8⁺T-Zellen wieder ab, kehrte jedoch bis zum 35. Tag ($8,8 \pm 0,3$ %) nicht auf das Ausgangsniveau zurück.

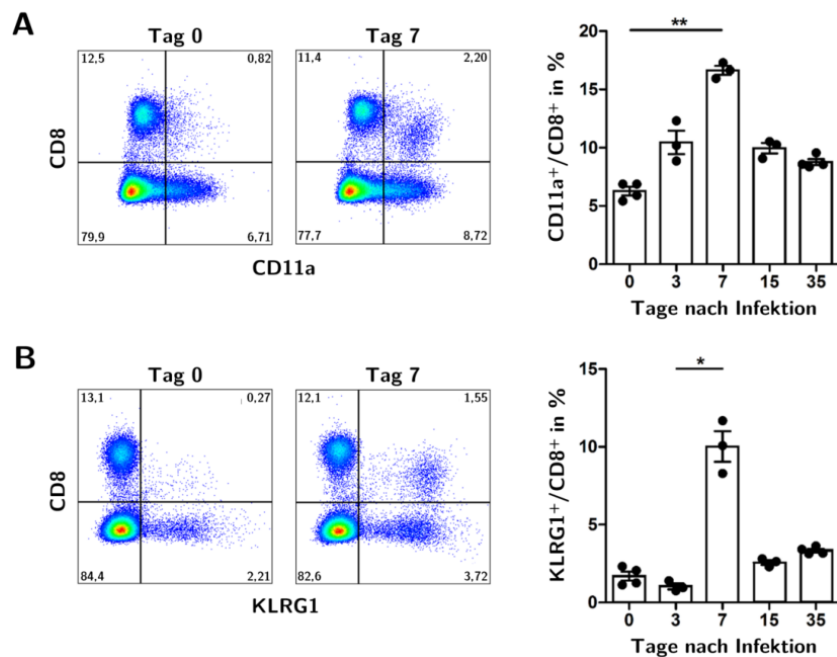


Abbildung 4.18: Nachweis Antigen-erfahrener CD8⁺T-Zellen im Verlauf der *R. typhi*-Infektion in BALB/c-Mäusen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von CD11a und KLRG1 auf CD8⁺T-Zellen in der Milz naiver (Tag 0) und *R. typhi*-infizierter Mäuse im Verlauf der Infektion analysiert. Dot Plots zeigen repräsentative Färbungen von CD8, CD11a (A) und KLRG1 (B) in einer naiven und einer infizierten Maus am 7. Tag nach Infektion (links). Graphisch dargestellt ist der prozentuale Anteil CD11a- (A) bzw. KLRG1-exprimierender CD8⁺T-Zellen (B) im Verlauf der Infektion (rechts) (Mittelwert $\pm$ SEM). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4 Ergebnisse

Eine Analyse der Expression von KLRG1 auf CD8⁺T-Zellen kann Aufschluss über den Differenzierungsgrad der T-Zellen geben und wurde als nächstes durchgeführt (Abb. 4.18 B). Der größte Anteil KLRG1-exprimierender CD8⁺T-Zellen zeigte sich 7 Tage nach *R. typhi*-Infektion ($10,0 \pm 1,0$ %). Die Frequenz an CD8⁺KLRG1⁺T-Zellen war hier im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe ($1,7 \pm 0,3$ %) um das 6fache erhöht. Der Anteil KLRG1-exprimierender CD8⁺T-Zellen sank im weiteren Verlauf der Infektion deutlich ab. Dennoch ließ sich 35 Tage nach der Infektion erneut eine Verdoppelung der Antigen-erfahrenen CD8⁺T-Zellen ($3,3 \pm 0,1$ %) im Vergleich zur naiven Kontrolle nachweisen.

Zur weiteren Charakterisierung der T-Zellantwort während einer *R. typhi*-Infektion wurde die Expression von IFN γ , TNF α und Granzym B untersucht. Durch die Expressionsanalyse dieser Effektormoleküle lassen sich weitere Informationen über T-Zelleffektorfunktionen gewinnen, die bei der Bekämpfung einer *R. typhi*-Infektion in BALB/c-Mäusen von Bedeutung sein könnten. Für die Untersuchung wurden Milzzellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion (Tag 0, 7, 15, 35) aus BALB/c-Mäusen isoliert und mit PMA/Ionomycin polykonal restimuliert. Nach der Oberflächenfärbung von CD8 und CD4 wurde die intrazelluläre Färbung von IFN γ , TNF α und Granzym B durchgeführt. Die Effektormoleküle in den T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. In Abbildung 4.19 ist der Anteil der IFN γ -, TNF α - und Granzym B-Produzenten innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion dargestellt. Die IFN γ -Synthese der CD8⁺T-Zellen nahm im Verlauf der Infektion signifikant zu. Am 7. ($19,3 \pm 1,9$ %) und 35. Tag ($19,9 \pm 0,5$ %) nach Infektion waren hierbei die größten Anteile IFN γ -exprimierender CD8⁺T-Zellen nachweisbar. An beiden Tagen konnte eine Verdoppelung der IFN γ -Produzenten im Vergleich zur naiven Kontrolle ($9,9 \pm 0,8$ %) beobachtet werden. Eine signifikante Veränderung des Anteils an CD8⁺T-Zellen, die TNF α exprimiert, zeigte sich im Verlauf der Infektion nicht (Abb. 4.19, B). Vergleichsweise ließen sich auch hier die meisten TNF α -synthetisierenden CD8⁺T-Zellen 35 Tage nach Infektion ($37,8 \pm 2,7$ %) detektieren. Während der *R. typhi*-Infektion nahm der Anteil an CD8⁺T-Zellen, in denen Granzym B nachweisbar war, signifikant zu. So erhöhte sich die Frequenz der Granzym B-Produzenten am 7. Tag der Infektion ($5,2 \pm 0,5$ %) um das 7fache im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe ($0,8 \pm 0,1$ %). Im weiteren Infektionsverlauf verringerte sich der Anteil dieser Zellen deutlich, blieb jedoch gegenüber dem Ausgangsniveau bis zum 35. Tag ($1,9 \pm 0,1$ %) doppelt so hoch.

4 Ergebnisse

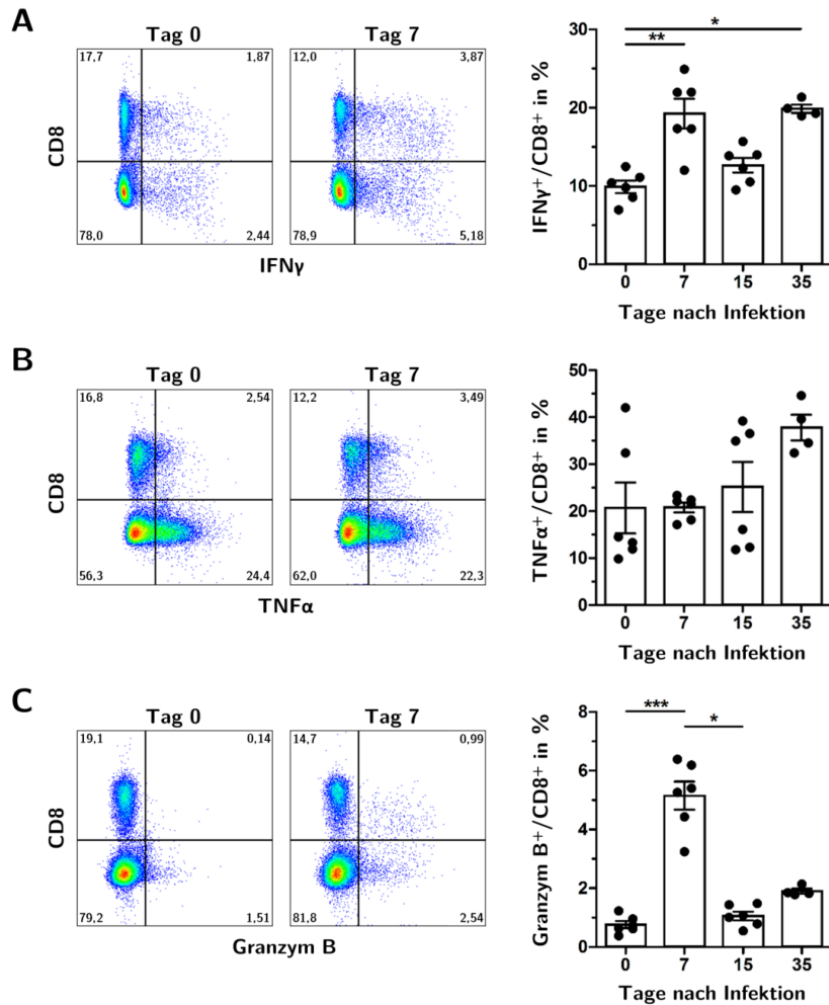


Abbildung 4.19: Im Verlauf der *R. typhi*-Infektion wird in BALB/c-Mäusen eine zytotoxische CD8⁺T-Zellantwort induziert. Nach *in vitro* Restimulation wurden IFN γ (A), TNF α (B) und Granzym B (C) in CD8⁺T-Zellen naiver (Tag 0) und *R. typhi*-infizierter BALB/c-Mäuse nachgewiesen. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion. Dot Plots zeigen exemplarisch die Färbung von CD8, IFN γ , TNF α und Granzym B in der Milz einer naiven und einer *R. typhi*-infizierten Maus (7 Tage nach Infektion) (links). In den Balkendiagrammen ist der Anteil CD8⁺T-Zellen dargestellt, in dem sich die Synthese der Effektormoleküle nachweisen ließ (rechts). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Abgebildet sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente (Mittelwert $\pm$ SEM). Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

Antigen-erfahrene CD4⁺T-Zellen exprimieren im Vergleich zu naiven CD4⁺T-Zellen ebenfalls vermehrt CD11a auf ihrer Oberfläche [175, 176]. Ein signifikanter Anstieg der Expression von CD11a auf CD4⁺T-Zellen ließ sich im Infektionsverlauf nicht feststellen. Im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle ($17,6 \pm 1,0$ %) konnte jedoch vom 7. ($23,2 \pm 1,6$ %) bis zum 35. Tag ($22,6 \pm 1,4$ %) nach Infektion ein leicht erhöhter Anteil CD11a-exprimierender CD4⁺T-Zellen nachgewiesen werden.

4 Ergebnisse

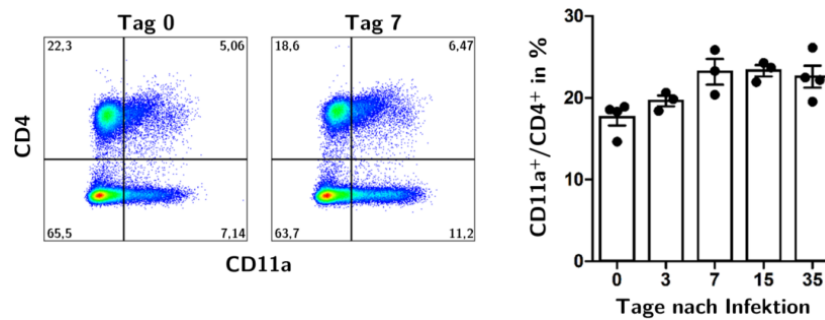


Abbildung 4.20: Expression von CD11a auf CD4⁺T-Zellen im Verlauf der *R. typhi*-Infektion in BALB/c-Mäusen. Isolierte Milzzellen von naiven (Tag 0) und *R. typhi*-infizierten BALB/c-Mäusen wurden zu angegebenen Infektionszeitpunkten bezüglich des Anteils an CD11a-exprimierenden Zellen innerhalb der CD4⁺T-Zellpopulation untersucht. Dot Plots zeigen exemplarisch die Färbung von CD4 und CD11a in der Milz einer naiven und einer infizierten Maus am 7. Tag nach *R. typhi*-Infektion (links). Graphisch dargestellt ist das Ergebnis der durchflusszytometrischen Expressionsanalyse von CD11a auf CD4⁺T-Zellen im Verlauf der Infektion (rechts) (Mittelwert $\pm$ SEM). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test.

Anschließend wurde die Expression von IFN γ , TNF α und Granzym B in CD4⁺T-Zellen im Infektionsverlauf untersucht. Abbildung 4.21 zeigt die Anteile an CD4⁺T-Zellen, die IFN γ , TNF α oder Granzym B synthetisierten. Im Verlauf der *R. typhi*-Infektion nahm der Anteil an IFN γ -Produzenten innerhalb der CD4⁺T-Zellpopulation signifikant zu. Gegenüber der naiven Kontrolle ($5,7 \pm 0,3$ %) konnte ein deutlicher Anstieg der IFN γ -exprimierenden CD4⁺T-Zellen am 7. Tag nach Infektion ($8,6 \pm 0,6$ %) beobachtet werden. Am 15. Tag ($7,5 \pm 0,5$ %) sank der Anteil der IFN γ -synthetisierenden CD4⁺T-Zellen wieder leicht ab, bevor 35 Tage nach der Infektion ein zweites Maximum erkennbar war. Im Vergleich zum 7. Tag nach Infektion ließ sich zu diesem späten Infektionszeitpunkt sogar ein höherer Anteil an IFN γ -Produzenten ($10,8 \pm 0,7$ %) detektieren. Eine signifikante Veränderung hinsichtlich der TNF α -Produktion war innerhalb der CD4⁺T-Zellpopulation nicht zu beobachten (Abb. 4.21 B). Des Weiteren konnte die Bildung zytotoxischer CD4⁺T-Zellen, die Granzym B exprimieren, im Infektionsverlauf nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.21 C).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass *R. typhi* in BALB/c-Mäusen wie in C57BL/6-Mäusen eine T_H1-gerichtete CD4⁺T-Zellantwort sowie eine zytotoxische CD8⁺T-Zellantwort induziert. Das Maximum der T-Zellantwort zeigte sich am 7. Tag nach Infektion. Anders als bei C57BL/6-Mäusen kommt es bei BALB/c-Mäusen im Infektionsverlauf zu einer erneuten T-Zellaktivierung.

4 Ergebnisse

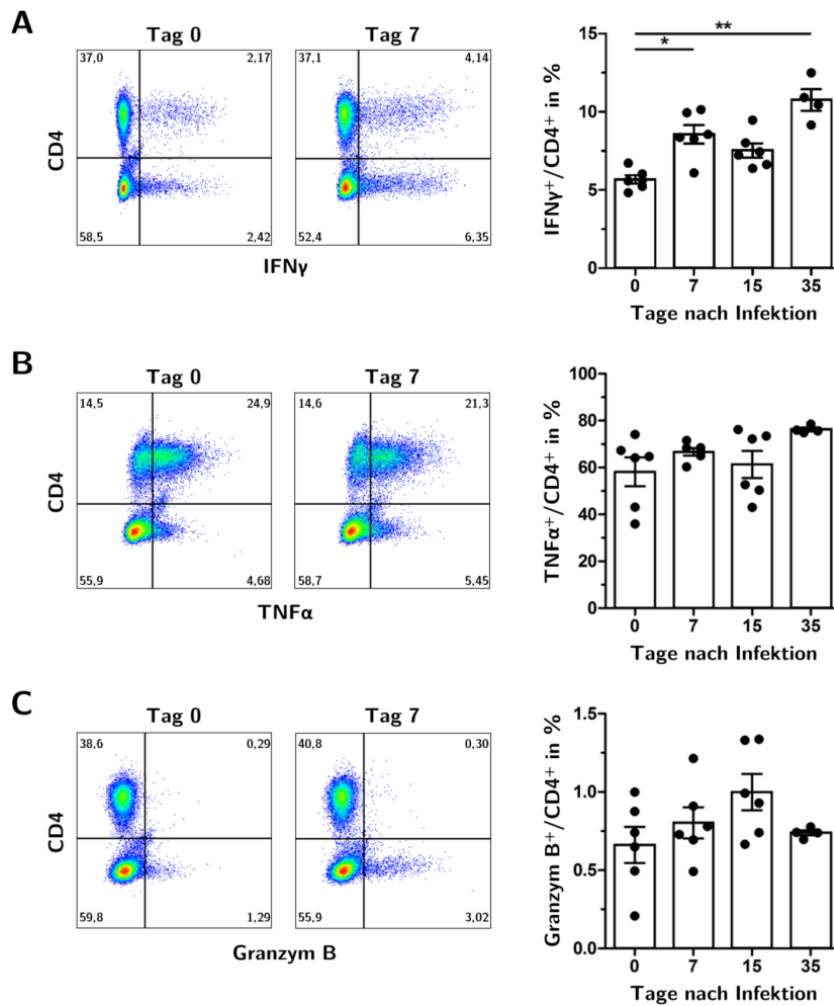


Abbildung 4.21: BALB/c-Mäuse induzieren im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion eine langanhaltende CD4⁺ T_H1-Antwort. Milzzellen wurden zu angegebenen Zeitpunkten aus naiven (Tag 0) und *R. typhi*-infizierten BALB/c-Mäusen isoliert und mit PMA/Ionomycin stimuliert. IFN γ , TNF α und Granzym B wurden intrazellulär gefärbt und der Anteil an CD4⁺T-Zellen, der diese Effektormoleküle synthetisiert, durchflusszytometrisch ermittelt. Gezeigt sind Dot Plots repräsentativer Färbungen von CD4, IFN γ (A), TNF α (B) und Granzym B (C) in der Milz einer naiven und einer infizierten Maus (Tag 7) (links). Der Anteil der CD4⁺T-Zellen, der IFN γ , TNF α bzw. Granzym B exprimiert, ist graphisch dargestellt (rechts). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Abgebildet sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente (Mittelwert $\pm$ SEM). Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.2.2 BALB/c RAG2^{-/-}-Mäuse zeigen nach *R. typhi*-Infektion die gleichen Symptome wie CB17 SCID-Mäuse

Bei CB17 SCID-Mäusen führt eine Mutation des Gens, das für die DNA-anhängige Proteinkinase (DNA-PKcs) kodiert, zur T- und B-Zelldefizienz. In C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen ist das Fehlen des rekombinationsaktivierenden Gens 1 für diesen Immundefekt verantwortlich. Beide Enzyme sind in der Rekombination des Antigenrezeptors von T- und B-Zellen involviert. Die DNA-PKcs ist darüber hinaus an weiteren DNA-Reparaturprozessen betei-

4 Ergebnisse

ligt. Ihr Fehlen kann sich daher auch auf andere Vorgänge auswirken. Um sicher zu stellen, dass der, in CB17 SCID-Mäusen beobachtete, Infektionsverlauf tatsächlich auf das Fehlen der adaptiven Immunantwort zurückzuführen ist, wurde der Verlauf einer *R. typhi*-Infektion auch in BALB/c RAG2^{-/-}-Mäusen analysiert. Der Gesundheitszustand der infizierten BALB/c RAG2^{-/-}-Mäuse wurde über einen Zeitraum von 20 Tagen begutachtet. Die Beurteilung erfolgte unter Verwendung eines Bewertungssystems, das den Fellzustand, die Aktivität, Haltung sowie das Gewicht der Mäuse berücksichtigte. Die Bewertung dieser Kriterien ergab einen klinischen Score von 0 (gesund) bis 10 (schwer erkrankt) (Abschn. 3.3.2, [115]). In Abbildung 4.22 sind die Resultate der Beobachtungen, die bei BALB/c RAG2^{-/-}-Mäusen gemacht wurden, denen von CB17 SCID-Mäusen gegenübergestellt. Gezeigt ist die Überlebensrate, der klinische Score sowie die relative Gewichtsveränderung im Verlauf der Infektion. BALB/c RAG2^{-/-}-Mäuse erkrankten im selben Zeitraum und wiesen die gleiche Symptomatik nach *R. typhi*-Infektion wie CB17 SCID-Mäuse auf. Erste Krankheitssymptome wie gesträubtes Fell und eine gekrümmte Körperhaltung traten etwa 10 Tage nach der Infektion auf. Wie bei den CB17 SCID-Mäusen verschlechterte sich der Zustand der Tiere innerhalb weniger Tage derartig, dass sie aufgrund der Schwere der Erkrankung von ihrem Leiden erlöst werden mussten. Bei Sektion dieser Mäuse zeigte sich, ebenso wie bei CB17 SCID-Mäusen, eine starke Vergrößerung der Milz und eine Nekrotisierung der Leber. Zum Todeszeitpunkt wurde die Bakterienlast in Gehirn, Lunge, Leber und Milz bestimmt (Abb. 4.22 D). Auch in BALB/c RAG2^{-/-}-Mäusen konnte die höchste Erregerlast in der Milz und im Gehirn nachgewiesen werden, wenngleich sich im Gehirn infizierter CB17 SCID-Mäuse deutlich mehr *R. typhi*-Kopien detektieren ließen.

Dieses Ergebnis legt nahe, dass der Infektionsverlauf in CB17 SCID-Mäusen in der Tat auf das Fehlen von T- und B-Zellen und nicht auf unspezifische Effekte zurückzuführen ist. Demnach ist der genetische Hintergrund und nicht die Mutation an sich für die unterschiedlichen Krankheitsbilder in CB17 SCID- und C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen verantwortlich.

4 Ergebnisse

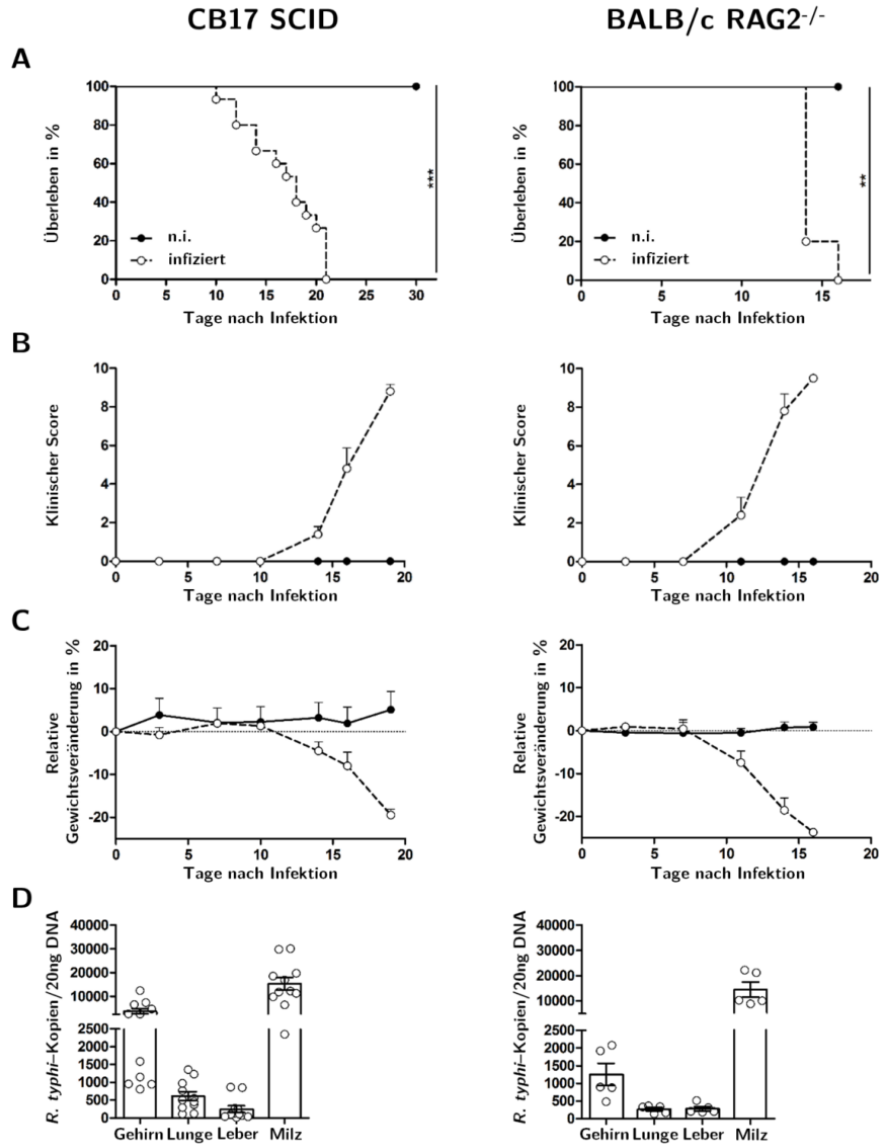


Abbildung 4.22: BALB/c RAG2^{-/-}-Mäuse zeigen nach *R. typhi*-Infektion das gleiche Krankheitsbild wie CB17 SCID-Mäuse. CB17 SCID- und BALB/c RAG2^{-/-}-Mäuse wurden mit 1×10^8 *R. typhi* (s.c.) infiziert. Nicht infizierte Mäuse wurden zur Kontrolle verwendet. Gezeigt ist die Überlebensrate (A), der klinische Score (B) sowie die relative Gewichtsveränderung (C) im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion. Dargestellt ist zudem die Erregerlast in Gehirn, Lunge, Leber und Milz zum Todeszeitpunkt der Mäuse (Mittelwert $\pm$ SEM) (D). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Der statistische Vergleich der Überlebensraten erfolgte mit Log-Rank-Test (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.2.3 CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen schützen CB17 SCID-Mäuse vor dem letalen Verlauf einer *R. typhi*-Infektion

In T- und B-Zell-defizienten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺T-Zellen Schutz vor einer *R. typhi*-bedingten Erkrankung vermitteln. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob ein adoptiver Transfer von CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen auch CB17 SCID-Mäuse vor einem tödlichen Ausgang der Infektion schützt. In Abbildung 4.23 ist der Ablauf solcher T-Zelltransferexperimente schematisch dargestellt. CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen wurden aus Milzen naiver BALB/c-Mäuse angereichert und in CB17 SCID-Mäuse injiziert. Kontrollmäuse erhielten PBS anstelle von T-Zellen. Einen Tag nach T-Zelltransfer bzw. PBS-Injektion wurden die Mäuse mit einer letalen Dosis *R. typhi* infiziert.

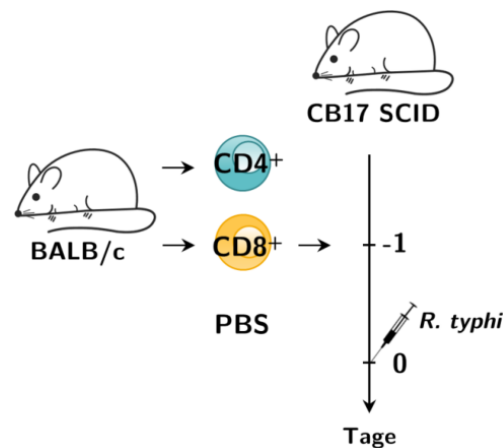


Abbildung 4.23: Schematische Darstellung des adoptiven Transfers von T-Zellen in CB17 SCID-Mäuse. CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen wurden aus der Milz naiver BALB/c-Mäuse isoliert und in die laterale Schwanzvene von CB17 SCID-Mäusen injiziert. Kontrollmäuse erhielten PBS anstelle von T-Zellen. Die *R. typhi*-Infektion erfolgte einen Tag nach T-Zelltransfer bzw. PBS-Injektion.

Der Nachweis der T-Zellen im Blut erfolgte am 7. Tag nach Infektion (Abb. 4.24 A). Nach Transfer von CD4⁺T-Zellen ließ sich im Blut der Mäuse nur diese T-Zellsubpopulation feststellen. Gleiches war nach CD8⁺ T-Zelltransfer zu beobachten. Der Anteil von CD4⁺T-Zellen an der Leukozytenpopulation lag 7 Tage nach Transfer durchschnittlich bei 6,3 ± 0,3 %, der der CD8⁺T-Zellen bei 2,6 ± 0,7 %. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 80 Tagen kontrolliert. Die Beurteilung erfolgte unter Verwendung des zuvor beschriebenen Scoresystems. In Abbildung 4.24 B ist die Überlebensrate, der klinische Score sowie die Gewichtsveränderung im Infektionsverlauf dargestellt. Eine Infektion mit *R. typhi* verlief in CB17 SCID-Mäusen, die CD8⁺T-Zellen transferiert bekamen, völlig asymptomatisch (Abb. 4.24 B). Der Transfer von CD8⁺T-Zellen verlieh den immundefizienten Mäusen einen 100 %igen Schutz. Ein Großteil der Mäuse, die CD4⁺T-Zellen erhalten hatten, entwickelte im Verlauf der Infektion Krankheitssymptome. Diese setzten zur gleichen Zeit wie bei den infizierten Kontrollmäusen ein. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe erhielten

4 Ergebnisse

sich die Mäuse wieder und 90 % der Tiere überlebten die Infektion.

CB17 SCID-Mäuse entwickeln während einer *R. typhi*-Infektion diffuse Lebernekrosen [115]. Nekrotische Areale sind bei Sektion *R. typhi*-infizierter CB17 SCID-Mäuse bereits makroskopisch erkennbar [115]. Eine Leberentzündung führt zu einem Anstieg der GPT-Konzentration im Blut. Eine Analyse der GPT-Werte erfolgte auch bei den *R. typhi*-infizierten Empfänger-mäusen. In Abbildung 4.24 C sind die gemittelten GPT-Werte im Verlauf der *R. typhi*-Infektion dargestellt. Während die GPT-Werte bei CB17 SCID-Mäusen nach CD8⁺ T-Zelltransfer relativ konstant blieben, stieg die GPT-Konzentration in den Mäusen, die CD4⁺ T-Zellen erhalten hatten, deutlich an. Erhöhte GPT-Werte ließen sich 14 Tage nach *R. typhi*-Infektion im Serum dieser Mäuse nachweisen ($91,0 \pm 13,0$ U/l) - zu einem Zeitpunkt an dem Krankheitssymptome deutlich sichtbar waren. Der Anstieg ähnelte dem in den infizierten Kontrollmäusen ($78,6 \pm 24,2$ U/l). Im weiteren Infektionsverlauf sank die GPT-Konzentration in den Empfängermäusen wieder und erreichte 21 Tage nach Infektion ($21,0 \pm 2,9$ U/l) nahezu das Ausgangsniveau ($13,9 \pm 0,7$ U/l).

4 Ergebnisse

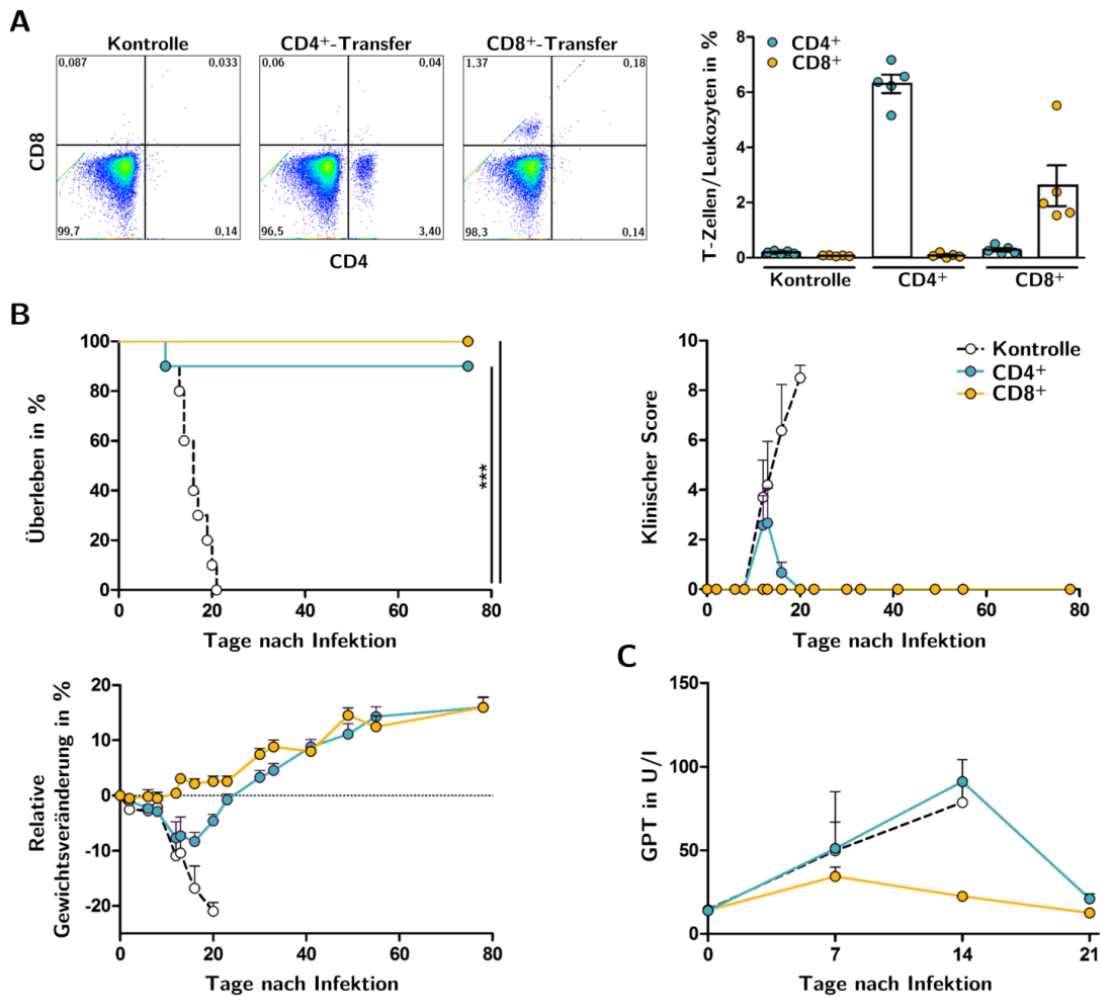


Abbildung 4.24: CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen schützen *R. typhi*-infizierte CB17 SCID-Mäuse vor einem letalen Krankheitsverlauf. Gereinigte CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen wurden CB17 SCID-Mäusen intravenös injiziert. Kontrollmäuse erhielten PBS. Einen Tag nach T-Zelltransfer bzw. PBS-Injektion wurden die Mäuse mit 1×10^8 *R. typhi* infiziert. Ein durchflusszytometrischer Nachweis der T-Zellen im Blut erfolgte 7 Tage nach Transfer (A). Gezeigt sind repräsentative Färbungen von T-Zellen im Blut einer Kontrollmaus sowie von Mäusen, die CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen transferiert bekamen (links). Die prozentualen Anteile von CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen an der Leukozytenpopulation sind im Balkendiagramm angegeben (rechts). Der Gesundheitszustand der infizierten Mäuse wurde nach T-Zelltransfer engmaschig dokumentiert. Die Überlebensrate, der klinische Score sowie die relative Gewichtsveränderung im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion sind graphisch dargestellt (B). Zum Nachweis einer Leberschädigung wurde die GPT-Konzentration im Serum zu angegebenen Zeitpunkten bestimmt (C). Abgebildet ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert $\pm$ SEM, n=5). Eine Kombination beider Experimente ist bei der Überlebensrate gezeigt (Kontrolle n=10, CD4⁺ n=10, CD8⁺ n=11). Der statistische Vergleich der Überlebensraten erfolgte mit Log-Rank-Test (***) $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

Um auszuschließen, dass der T-Zell-vermittelte Schutz auf unspezifischen Effekten beruht, wie einem kurzzeitigen Anstieg der Zytokinproduktion nach T-Zelltransfer, wurde ein Transferexperiment in abgewandelter Form durchgeführt. Hierbei wurden die T-Zellen nicht einen sondern 14 Tage vor *R. typhi*-Infektion in CB17 SCID-Mäuse transferiert. Abbildung 4.25 stellt die Überlebensrate, den klinischen Score sowie die Gewichtsveränderung im Infektionsverlauf dar. CB17 SCID-Mäuse, die $CD8^+$ -T-Zellen erhalten hatten, zeigten auch bei diesem experimentellen Ablauf zu keinem Zeitpunkt der Infektion Symptome. Im Gegensatz dazu erkrankten Mäuse, die $CD4^+$ -T-Zellen transferiert bekamen, im gleichen Zeitrahmen wie die Kontrollmäuse. Alle Empfänger-mäuse erholten sich jedoch vollständig von der Erkrankung, während die Kontrollmäuse von ihrem Leiden erlöst werden mussten. Der Schutz ist daher nicht auf unspezifische Nebeneffekte zurückzuführen.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ -T-Zellen in der Lage sind, *R. typhi*-infizierte CB17 SCID-Mäuse vor einem tödlichen Krankheitsverlauf zu schützen. $CD4^+$ -T-Zellen sind dabei jedoch weniger effizient.

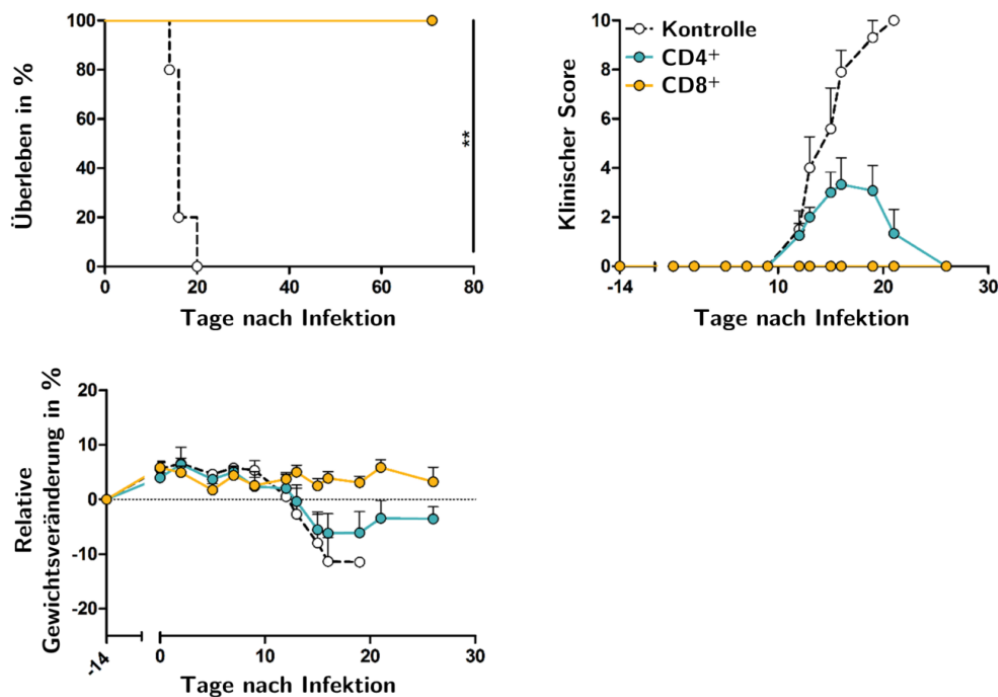


Abbildung 4.25: Der T-Zell-vermittelte Schutz von CB17 SCID-Mäusen ist unabhängig vom Transferzeitpunkt vor der Infektion. $CD4^+$ oder $CD8^+$ -T-Zellen wurden aus der Milz von BALB/c-Mäusen isoliert und in die laterale Schwanzvene von CB17 SCID-Mäusen injiziert. Kontrollmäusen wurde PBS anstelle von T-Zellen verabreicht. 14 Tage nach T-Zelltransfer wurden die Mäuse mit 1×10^8 *R. typhi* infiziert. Die Überlebensrate, der klinische Score und die relative Gewichtsveränderung im Verlauf der Infektion sind graphisch dargestellt. Gezeigt ist ein Experiment (Mittelwert $\pm$ SEM, Kontrolle n=5, $CD4^+$ n=6, $CD8^+$ n=6). Der statistische Vergleich der Überlebensraten erfolgte mit Log-Rank-Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.2.4 CD4⁺T-Zellen eliminieren *R. typhi* im Vergleich zu CD8⁺T-Zellen zeitlich verzögert, können die Bakterien jedoch langfristig kontrollieren

Die Auswirkung des T-Zelltransfers auf die Bakterienlast in CB17 SCID-Mäusen wurde mittels qPCR untersucht. Die Erregerlast wurde 7 Tage nach der Infektion und zum Ende des Experiments, am 175. Tag nach Infektion, in Gehirn, Rückenmark, Lunge, Leber und Milz bestimmt. Als Kontrolle wurden *R. typhi*-infizierte CB17 SCID-Mäuse verwendet, die PBS anstelle von T-Zellen injiziert bekamen. Hier erfolgte die Quantifizierung ebenfalls am 7. Tag nach Infektion und zum Todeszeitpunkt der Mäuse. Die Abbildung 4.26 zeigt das Ergebnis der qPCR-Analyse. Die Erregerlast in den Organen *R. typhi*-infizierter CB17 SCID-Mäuse war 7 Tage nach der Infektion noch verhältnismäßig gering (Abb. 4.26 A). Zu diesem Zeitpunkt ließen sich im Gehirn der Kontrollmäuse 100 ± 47 *R. typhi*-Kopien, im Rückenmark 986 ± 744 Kopien, in der Lunge 6 ± 2 Kopien, in der Leber 3 ± 2 Kopien und in der Milz 427 ± 264 Kopien pro 20 ng DNA detektieren. Nach dem Transfer von CD4⁺T-Zellen war die Bakterienlast in den Mäusen mit der in Kontrollmäusen vergleichbar - im Gehirn (217 ± 110 Kopien/20 ng), in der Lunge (22 ± 12 Kopien/20 ng) und in der Milz (932 ± 479 Kopien/20 ng) sogar leicht erhöht. In Mäusen, die CD8⁺T-Zellen transferiert bekamen, konnte im Vergleich zur Kontrolle bereits 7 Tage nach Infektion eine reduzierte Bakterienlast im Gehirn (34 ± 12 Kopien/20 ng), dem Rückenmark (268 ± 103 Kopien/20 ng), der Lunge (0 ± 0 Kopien/20 ng) und der Milz (11 ± 6 Kopien/20 ng) verzeichnet werden. In der Leber waren die Bakterien zu diesem Infektionszeitpunkt generell kaum detektierbar.

Im weiteren Verlauf der Infektion stieg die Erregerlast in den Kontrollmäusen um ein Vielfaches. Zum Todeszeitpunkt ließen sich im Gehirn der Tiere 2523 ± 1299 *R. typhi*-Kopien, im Rückenmark 12808 ± 5578 Kopien, in der Lunge 3897 ± 2983 Kopien, in der Leber 2766 ± 970 Kopien und in der Milz 40931 ± 17971 Kopien pro 20 ng DNA nachweisen (Abb. 4.26 B). Die *R. typhi*-Last in CB17 SCID-Mäusen, die mit T-Zellen ausgestattet wurden und eine Infektion infolgedessen überlebten, wurde 175 Tage nach der Infektion analysiert. Zu diesem späten Zeitpunkt konnte *R. typhi* in den Organen von Mäusen, die CD8⁺T-Zellen erhalten hatten, nicht mehr nachgewiesen werden. Darüber hinaus war eine erfolgreiche Eliminierung der Bakterien auch nach dem Transfer von CD4⁺T-Zellen zu beobachten. Mit Ausnahme einer Maus, in der sich eine geringe Kopienzahl in der Lunge (9 Kopien/20 ng) nachweisen ließ, waren die Bakterien in den CD4⁺ T-Zellrezipienten nicht mehr detektierbar.

Dieses Ergebnis zeigt, dass sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺T-Zellen *R. typhi* erfolgreich eliminieren können. CD4⁺T-Zellen sind dabei, wie bereits bei C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen gesehen, weniger effizient. Beide T-Zellsubpopulationen sind in der Lage, die Bakterien über einen langen Zeitraum zu kontrollieren.

4 Ergebnisse

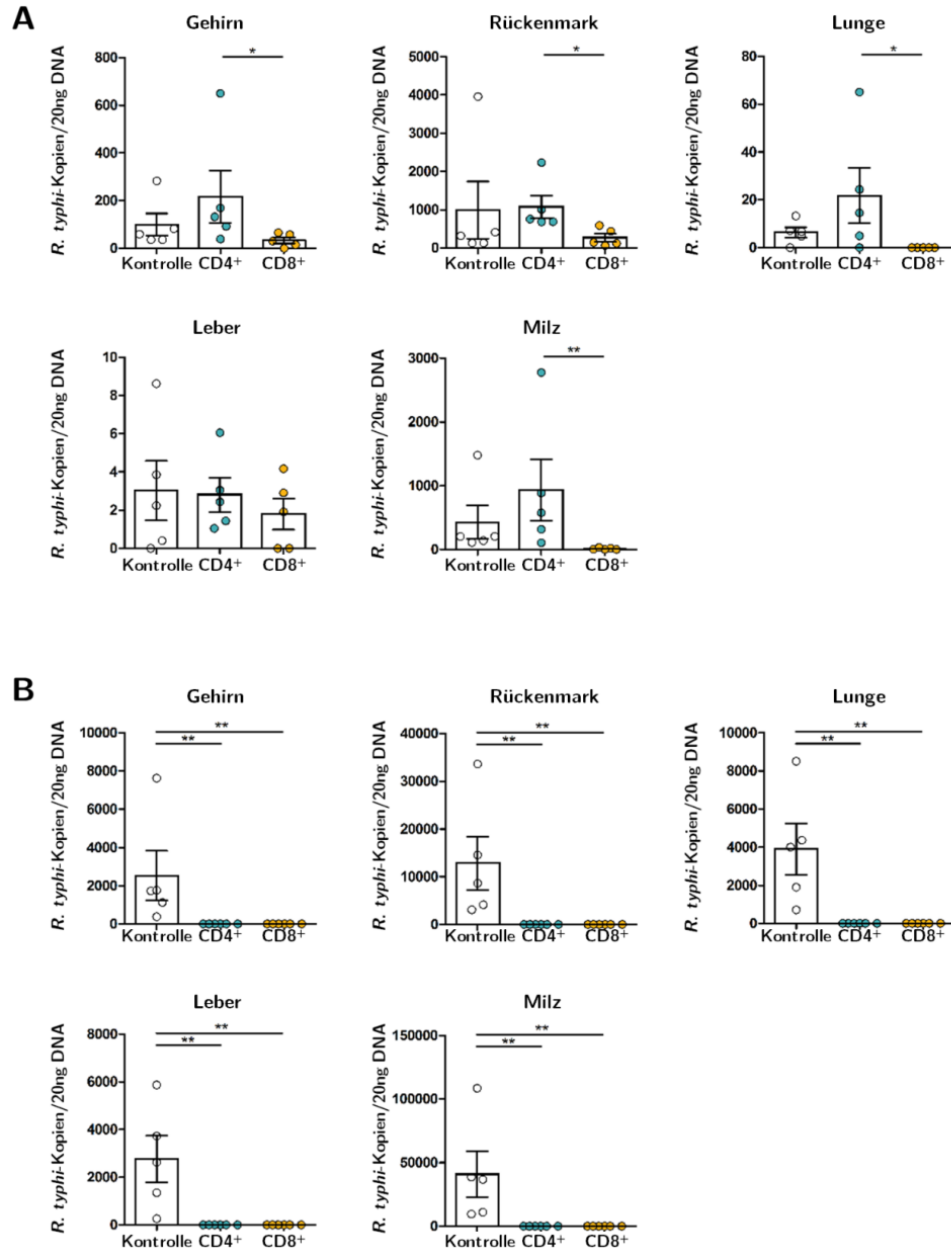


Abbildung 4.26: CD8⁺T-Zellen eliminieren *R. typhi* effizienter als CD4⁺T-Zellen. CB17 SCID-Mäuse wurden einen Tag nach dem Transfer von CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen mit *R. typhi* infiziert. Kontrollmäuse erhielten PBS anstelle von T-Zellen. Die Erregerlast wurde 7 Tage nach Infektion (A) und zum Todeszeitpunkt bzw. Experimentende (175 Tage nach Infektion) (B) in Gehirn, Rückenmark, Lunge, Leber und Milz bestimmt. Der Nachweis erfolgte mittels *R. typhi*-spezifischen qPCR. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.2.5 CB17 SCID-Mäuse weisen nach CD4⁺T-Zelltransfer erhöhte IFN γ -Konzentrationen im Serum auf

Um Anhaltspunkte darüber zu erhalten, welche Effektormechanismen beim T-Zell-vermittelten Schutz der CB17 SCID-Mäuse eine Rolle spielen, wurde die Serum-Zytokin-Konzentration 7 Tage nach Infektion bestimmt. Abbildung 4.27 zeigt die ermittelten Zytokinkonzentrationen in den Kontrollmäusen sowie den Mäusen, die CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen transferiert bekamen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren im Serum von CB17 SCID-Mäusen, die CD8⁺T-Zellen erhalten hatten, keine deutlichen Veränderungen hinsichtlich der Zytokinfreisetzung zu erkennen. Im Gegensatz dazu wiesen Mäuse im Serum nach dem Transfer von CD4⁺T-Zellen eine 7-mal so hohe IFN γ -Konzentration ($1963,3 \pm 982,3$ pg/ml) wie die Kontrollgruppe ($248,8 \pm 34,5$ pg/ml) auf. Zudem wurde im Serum der CD4⁺ T-Zellrezipienten eine erhöhte Konzentration von TNF α , einem weiteren T_H1-Zytokin, gemessen ($13,0 \pm 5,4$ pg/ml). Dieses Zytokin war im Serum der Kontrollmäuse kaum nachweisbar ($3,5 \pm 1,2$ pg/ml). In CB17 SCID-Mäusen ließ sich 7 Tage nach dem CD4⁺ T-Zelltransfer ebenfalls ein Anstieg der IL-6-Konzentration beobachten. Sowohl die Konzentrationen von TNF α als auch IL-6 blieben jedoch auf einem niedrigen Niveau. Eine gesteigerte Freisetzung von T_H2- (IL-4, IL-13) oder T_H17-Zytokinen (IL-17A/F, IL-22) wurde nicht detektiert. Diese Zytokine waren in keiner der untersuchten Gruppen nachweisbar. Die transferierten CD4⁺T-Zellen zeigen demnach auch *in vivo* einen T_H1-Phänotyp.

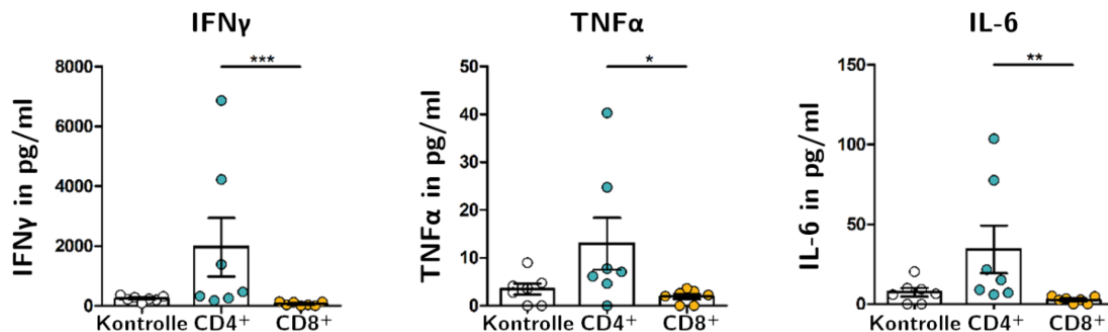


Abbildung 4.27: Serum-Zytokin-Profil von CB17 SCID-Mäusen nach T-Zelltransfer. Die Zytokinkonzentration wurde im Serum von CB17 SCID-Mäusen 8 Tage nach T-Zelltransfer bzw. PBS-Injektion (7 Tage nach Infektion) durchflusszytometrisch analysiert. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.3 Untersuchung der von CD8⁺ und CD4⁺T-Zellen benötigten Effektormechanismen zum Schutz gegenüber *R. typhi*

Die Analyse der Effektorfunktionen von T-Zellen in BALB/c-Mäusen sowie nach T-Zelltransfer in CB17 SCID-Mäusen hat gezeigt, dass während einer *R. typhi*-Infektion eine klassische CD4⁺T_H1-Immunantwort eingeleitet wird. Diese ist durch eine gesteigerte Expression von IFN γ und TNF α charakterisiert. Auch CD8⁺T-Zellen setzen vermehrt IFN γ frei. Darüber hinaus synthetisieren CD8⁺T-Zellen verstärkt Granzym B und sind demnach zytotoxisch aktiv. Im Folgenden wurde die Rolle von IFN γ , TNF α und der zytotoxischen Funktion von CD8⁺T-Zellen für den Schutz gegenüber *R. typhi* näher untersucht.

4.3.1 BALB/c IFN γ ^{-/-} und BALB/c Perforin^{-/-}-Mäuse sind gegenüber *R. typhi* resistent

Während IFN γ eine große Bedeutung bei der Aktivierung von Makrophagen zukommt [185], wird Perforin neben Granzym für die zytotoxische Aktivität benötigt [186]. Um einen ersten Anhaltspunkt über die Bedeutung von IFN γ und Perforin bei der Abwehr von *R. typhi* zu erhalten, wurden zunächst BALB/c-Mäuse infiziert, die kein IFN γ oder Perforin synthetisieren können. In Abbildung 4.28 sind die Überlebensraten, die klinischen Scores sowie die relativen Gewichtsveränderungen im Infektionsverlauf dargestellt. Weder IFN γ - noch Perforin-defiziente Mäuse ließen nach *R. typhi*-Infektion Anzeichen einer Erkrankung erkennen. Die infizierten Mäuse überlebten eine Infektion mehr als 120 Tage. Ein langanhaltender Schutz ist somit auch gegeben, wenn eines der beiden Effektormoleküle fehlt.

4 Ergebnisse

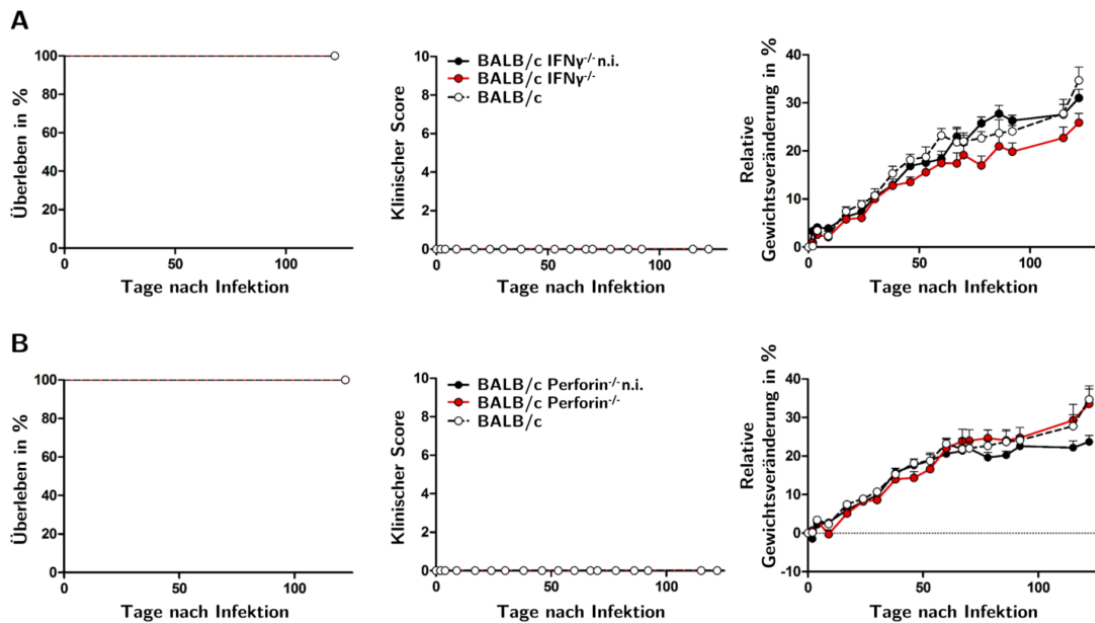


Abbildung 4.28: Eine *R. typhi*-Infektion verläuft bei BALB/c $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ - und BALB/c Perforin $^{-/-}$ -Mäusen asymptomatisch. BALB/c Wildtyp-Mäuse sowie $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ - und Perforin-defiziente Mäuse wurden mit *R. typhi* (s.c.) infiziert. Naive BALB/c $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ - und BALB/c Perforin $^{-/-}$ -Mäuse galten als Kontrollen. Graphisch dargestellt ist die Überlebensrate (links), der klinische Score (Mitte) und die relative Gewichtsveränderung (rechts) der $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ - (A) und Perforin $^{-/-}$ -Mäuse (B) im Verlauf der Infektion.

4.3.2 CD8^+ und CD4^+ T-Zellen können CB17 SCID-Mäuse unabhängig von $\text{IFN}\gamma$ schützen

Um die Rolle von $\text{IFN}\gamma$ und Perforin für den CD4^+ und CD8^+ T-Zell-vermittelten Schutz eingehender zu untersuchen, wurden T-Zelltransferexperimente durchgeführt. Hierfür wurden zunächst CD4^+ oder CD8^+ T-Zellen aus BALB/c $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen isoliert. Die gereinigten T-Zellen wurden im Anschluss CB17 SCID-Mäusen intravenös injiziert. Kontrollmäuse erhielten PBS anstelle von T-Zellen. Einen Tag nach dem Transfer der T-Zellen bzw. der PBS-Injektion wurden die Mäuse mit *R. typhi* infiziert. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde daraufhin über einen Zeitraum von 80 Tagen beurteilt. Abbildung 4.29 beschreibt das Ergebnis dieser Beobachtung. Die Hälfte aller CB17 SCID-Mäuse, die $\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^{-/-}$ T-Zellen erhalten hatten, erkrankte in Folge der *R. typhi*-Infektion. Wie die infizierten Kontrollmäuse wiesen auch diese Tiere eine gekrümmte Haltung, gesträubtes Fell, eine verminderte Aktivität und Gewichtsverlust auf. Die Symptome setzten im Vergleich zur Kontrolle jedoch etwas früher ein. Von den erkrankten Empfängermausen konnte sich die Hälfte wieder erholen. Insgesamt überlebten nach Transfer von $\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^{-/-}$ T-Zellen 75 % der *R. typhi*-infizierten CB17 SCID-Mäuse. Im Gegensatz dazu verlief die Infektion bei CB17 SCID-Mäusen, die CD8^+ $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ T-Zellen transferiert bekamen, völlig asymptomatisch und alle Mäuse überlebten.

4 Ergebnisse

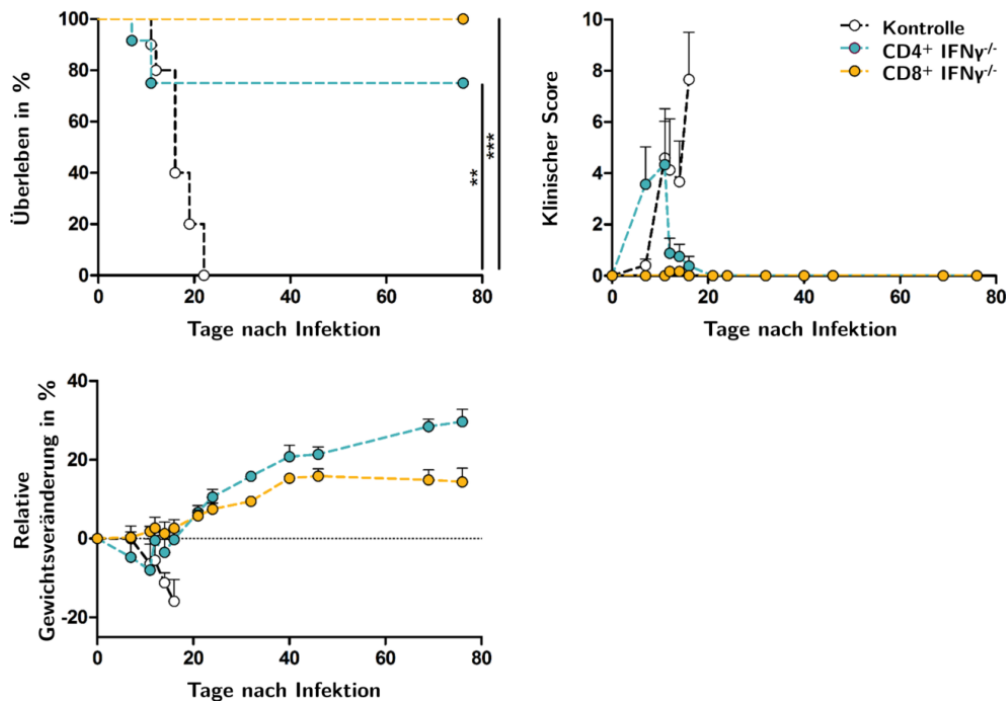


Abbildung 4.29: IFN γ ist für den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-vermittelten Schutz *R. typhi*-infizierter CB17 SCID-Mäuse nicht essenziell. CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen wurden aus BALB/c IFN γ ^{-/-}-Mäusen isoliert und CB17 SCID-Mäusen intravenös injiziert. Kontrollmäusen wurde PBS anstelle von T-Zellen verabreicht. Am Folgetag wurden die Tiere mit *R. typhi* infiziert. Der Gesundheitszustand wurde über einen Zeitraum von 80 Tagen dokumentiert. Dargestellt ist die Überlebensrate, der klinische Score sowie die relative Gewichtsveränderung im Verlauf der Infektion. Abgebildet ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert $\pm$ SEM, n=5-7). Eine Kombination beider Experimente ist bei der Überlebensrate gezeigt (Kontrolle n=10, CD4⁺IFN γ ^{-/-} n=12, CD8⁺IFN γ ^{-/-} n=10). Der statistische Vergleich der Überlebensraten erfolgte mit Log-Rank-Test (**p<0,01, ***p<0,001).

Zum Todeszeitpunkt bzw. nach Beendigung der Experimente (Tag 120/168 nach Infektion) wurde die Bakterienlast in Gehirn, Lunge, Leber und Milz bestimmt (Abb. 4.30). Der Nachweis der Bakterien erfolgte unter Verwendung einer *R. typhi*-spezifischen qPCR [170]. Wie erwartet, ließ sich zum Todeszeitpunkt in den Organen aller Kontrollmäuse eine hohe Erregerlast detektieren. Im Vergleich dazu wiesen Mäuse, die der Infektion trotz des Transfers von CD4⁺ IFN γ ^{-/-}-T-Zellen erlagen, eine verminderte Anzahl an Bakterien auf. CB17 SCID-Mäuse, die die *R. typhi*-Infektion nach dem Transfer der CD4⁺ IFN γ ^{-/-}-T-Zellen überlebten, zeigten nach Beendigung der Experimente eine signifikant reduzierte Erregerlast in allen Organen. Bei der Mehrheit der Mäuse waren die Bakterien zu diesem späten Zeitpunkt nach Infektion nicht mehr detektierbar. Lediglich bei 2 von 8 Mäusen wurde eine geringe Anzahl *R. typhi*-Kopien im Gehirn (5 Kopien/ 20 ng) bzw. im Gehirn (6 Kopien/ 20 ng) und in der Milz (1 Kopie/ 20 ng) festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Erreger auch in der Lunge, Leber und Milz von CD8⁺ T-Zellrezipienten kaum noch nachweisbar. Entgegen den Erwartungen waren IFN γ -defiziente CD8⁺T-Zellen gegenüber CD4⁺T-Zellen weniger effizient bei der Kontrolle der Bakterien. So ließ sich *R. typhi* bei über 80 % dieser Mäuse in geringen Mengen vorwie-

4 Ergebnisse

gend im Gehirn (172 ± 161 Kopien/ 20 ng) detektieren. Die überlebenden Empfänger­mäuse zeigten aber keine Krankheitssymptome. Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass $CD4^+$ und $CD8^+$ -T-Zellen unabhängig von $IFN\gamma$ Schutz gegenüber *R. typhi* vermitteln.

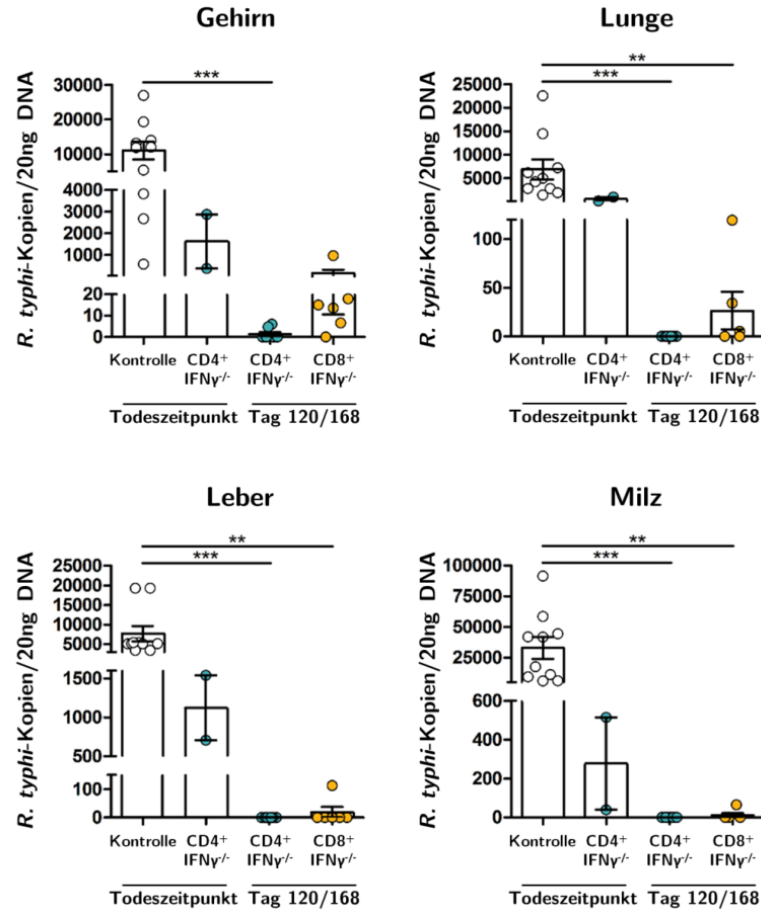


Abbildung 4.30: $CD4^+$ und $CD8^+$ -T-Zellen können *R. typhi* unabhängig von $IFN\gamma$ kontrollieren. Isolierte $CD4^+ IFN\gamma^{-/-}$ und $CD8^+ IFN\gamma^{-/-}$ T-Zellen wurden CB17 SCID-Mäusen intravenös injiziert. Kontrollmäuse erhielten PBS anstatt T-Zellen. Die Infektion mit *R. typhi* erfolgte einen Tag nach dem Transfer bzw. der PBS-Injektion. Zum Todeszeitpunkt sowie nach Beendigung der Experimente (120 bzw. 168 Tage nach Infektion) wurde die Bakterienlast in Gehirn, Lunge, Leber und Milz mittels qPCR bestimmt. Gezeigt ist die Kombination der Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente (Mittelwert $\pm$ SEM). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.3.3 Die Perforin-vermittelte Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen ist für den Schutz gegenüber *R. typhi* nicht notwendig

Nachfolgend wurde die Bedeutung der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellaktivität bei der Bekämpfung einer *R. typhi*-Infektion näher analysiert. Für diese Untersuchung wurden CD8⁺ T-Zellen aus BALB/c Perforin^{-/-}-Mäusen isoliert und in CB17 SCID-Mäuse transferiert. Die Kontrolltiere erhielten PBS anstatt T-Zellen. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Infektion mit *R. typhi*. Der Gesundheitszustand wurde wie zuvor über einen Zeitraum von 80 Tagen dokumentiert. In Abbildung 4.31 ist die Überlebensrate, der klinische Score sowie die relative Gewichtsveränderung im Infektionsverlauf dargestellt. Nach dem Transfer von CD8⁺ Perforin^{-/-} T-Zellen zeigten CB17 SCID-Mäuse zu keinem Zeitpunkt Anzeichen einer Erkrankung und überlebten die *R. typhi*-Infektion.

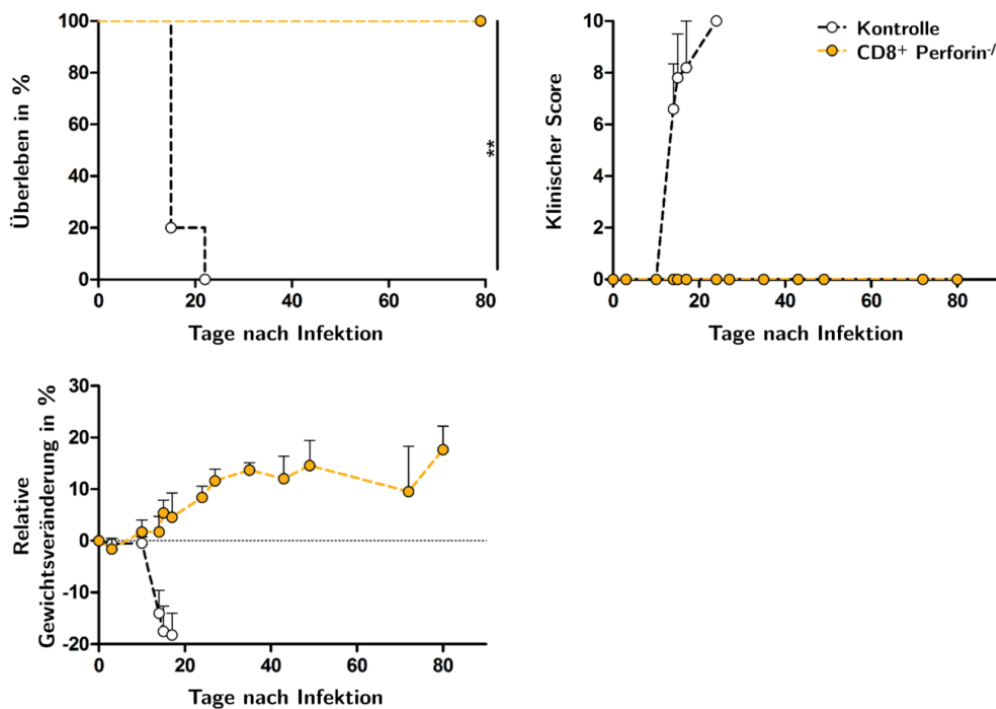


Abbildung 4.31: CD8⁺ T-Zellen schützen *R. typhi*-infizierte CB17 SCID-Mäuse unabhängig von Perforin. Gereinigte CD8⁺ Perforin^{-/-} T-Zellen wurden in CB17 SCID-Mäuse transferiert. Kontrollmäuse erhielten PBS anstelle T-Zellen. Einen Tag nach dem Transfer der T-Zellen bzw. der Injektion von PBS wurden die Mäuse mit *R. typhi* infiziert. Der Gesundheitszustand wurde über einen Zeitraum von 80 Tagen beurteilt. Dargestellt ist die Überlebensrate, der klinische Score sowie die relative Gewichtsveränderung im Infektionsverlauf. Gezeigt ist das Ergebnis eines Experiments (Mittelwert $\pm$ SEM, n=5). Der statistische Vergleich der Überlebensraten erfolgte mit Log-Rank-Test (** $p < 0,01$).

Die Bakterienlast zum Todeszeitpunkt bzw. Ende des Experiments ist in Abbildung 4.32 veranschaulicht. Während sich zum Todeszeitpunkt in den Organen infizierter Kontrollmäuse hohe Erregerlasten nachweisen ließen, konnte *R. typhi* am Ende des Experiments (128 Ta-

4 Ergebnisse

ge nach Infektion) in CB17 SCID-Mäusen, die CD8⁺T-Zellen aus BALB/c Perforin^{-/-}-Mäusen erhalten hatten, nicht mehr detektiert werden.

CD8⁺T-Zellen schützen *R. typhi*-infizierte CB17 SCID-Mäuse damit nicht nur unabhängig von IFN γ , sondern auch unabhängig ihrer Perforin-vermittelten Zytotoxizität.

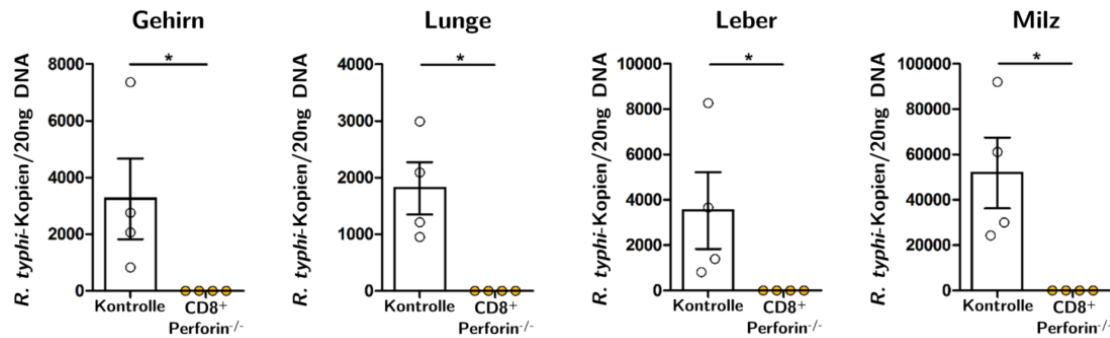


Abbildung 4.32: CD8⁺T-Zellen eliminieren *R. typhi* in infizierten CB17 SCID-Mäusen unabhängig von Perforin. Gereinigte CD8⁺T-Zellen aus BALB/c Perforin^{-/-}-Mäusen wurden in CB17 SCID-Mäuse transferiert. Kontrollmäusen wurde anstatt dessen PBS injiziert. Am Folgetag wurden die Mäuse mit *R. typhi* infiziert. Die Bakterienlast in den Kontrollmäusen wurde zum Todeszeitpunkt unter Verwendung einer *R. typhi*-spezifischen qPCR ermittelt. In den T-Zellempfängermäusen erfolgte der Nachweis von *R. typhi* nach Beendigung des Experiments, am 128. Tag nach Infektion. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* $p < 0,05$)

4.3.4 CD4⁺T-Zellen steigern die bakterizide Aktivität von Makrophagen *in vitro* durch die Freisetzung von TNF α und IFN γ

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass IFN γ für den durch CD4⁺T-Zellen vermittelten Schutz und die Eliminierung von *R. typhi* nicht zwingend erforderlich ist. Folglich wurde untersucht, welche Effektormechanismen für den Schutz in Abwesenheit von IFN γ verantwortlich sind. Neben einer gesteigerten IFN γ -Freisetzung ließ sich nach Transfer von CD4⁺T-Zellen auch eine erhöhte TNF α -Konzentration im Serum *R. typhi*-infizierter CB17 SCID-Mäuse nachweisen. TNF α ist neben IFN γ ein weiteres Zytokin, das in der Lage ist, die antimikrobielle Aktivität von Phagozyten zu steigern [187]. Möglicherweise kann TNF α das Fehlen von IFN γ kompensieren. Um die Bedeutung von TNF α bei der CD4⁺ T-Zell-vermittelten Eliminierung der Bakterien zu untersuchen, wurde der Einfluss des durch CD4⁺T-Zellen sekretierten TNF α und IFN γ auf die Aktivierung *R. typhi*-infizierter Makrophagen analysiert. Hierfür wurden CD4⁺T-Zellen aus naiven oder infizierten BALB/c-Mäusen isoliert und mit *R. typhi*-infizierten Knochenmarkmakrophagen inkubiert. TNF α und IFN γ wurden durch die Zugabe von Antikörpern neutralisiert. Der Erfolg der Neutralisation wurde im Überstand unter Verwendung eines Bead-basierten Immunassays durchflusszytometrisch überprüft. Abbildung 4.33 A zeigt die Konzentration von TNF α und IFN γ nach 72 Stunden Kokultur. Immune CD4⁺T-Zellen aus *R. typhi*-infizierten Mäusen setzten nach Antigenerkennung große Mengen IFN γ ($21749,3 \pm 9799,0$ pg/ml) und in geringeren Mengen auch TNF α ($85,0 \pm 23,7$ pg/ml)

4 Ergebnisse

frei. Im Gegensatz dazu führte die Anwesenheit *R. typhi*-infizierter Makrophagen bei naiven CD4⁺T-Zellen nicht zur TNF α - ($0,7 \pm 0,7$ pg/ml) oder IFN γ -Sekretion ($0,9 \pm 0,9$ pg/ml). Nach Zugabe der neutralisierenden Antikörper ließ sich in den Überständen eine verminderte TNF α - ($24,9 \pm 2,7$ pg/ml) und IFN γ -Konzentration ($1141,0 \pm 606,6$ pg/ml) nachweisen. Eine vollständige Neutralisation der beiden Zytokine wurde jedoch nicht erreicht. Um den Einfluss der Zytokine auf die bakterizide Aktivität der Makrophagen zu bestimmen, wurde zum einen die NO-Konzentration im Überstand und zum anderen die Erregerlast in den Makrophagen analysiert. Abbildung 4.33 B zeigt die durch Makrophagen freigesetzte Menge NO im Überstand der Kokulturen. Im Vergleich zu Kulturen mit naiven CD4⁺T-Zellen, in denen NO nicht detektierbar war, ließ sich in denen mit immunen CD4⁺T-Zellen eine signifikant gesteigerte NO-Synthese ($5,7 \pm 1,5$ μ M) feststellen. Trotz unvollständiger Neutralisierung beider Zytokine, produzierten Makrophagen sowohl in Anwesenheit von anti-TNF α ($0,3 \pm 0,2$ μ M) als auch anti-IFN γ ($0,4 \pm 0,2$ μ M) deutlich weniger NO. Anschließend wurde die Bakterienlast in den Makrophagen mittels *R. typhi*-spezifischen qPCR bestimmt (Abb. 4.33 C). Im Gegensatz zu naiven CD4⁺T-Zellen hemmte die Anwesenheit von immunen CD4⁺T-Zellen das Bakterienwachstum in *R. typhi*-infizierten Makrophagen deutlich. Während sich in Makrophagen, die mit naiven CD4⁺T-Zellen inkubiert wurden, durchschnittlich 181 ± 90 *R. typhi*-Kopien nachweisen ließen, befanden sich in Kokulturen mit immunen CD4⁺T-Zellen nur 5 ± 2 Kopien. Die Neutralisation von IFN γ (32 ± 27 Kopien) oder IFN γ und TNF α in Kombination (54 ± 34 Kopien) führte wieder zu einer leichten Zunahme des Bakterienwachstums. Eine alleinige Zugabe von anti-TNF α hatte kaum eine Auswirkung auf die Erregerlast (11 ± 6 Kopien). Die Neutralisierung der beiden Zytokine führte somit nicht zum Anstieg des Bakterienwachstums auf das Ausgangsniveau. Eine mögliche Ursache dafür könnte die unvollständige Neutralisation der Zytokine sein (Abb. 4.33 A).

Für den direkten Nachweis des Einflusses von TNF α und IFN γ auf das *R. typhi*-Wachstum, wurden infizierte Makrophagen mit rekombinantem TNF α und IFN γ behandelt. Abbildung 4.33 D stellt die Erregerlast in den Makrophagen 72 Stunden nach Zugabe der Zytokine dar. Die Anwesenheit von TNF α (90 ± 40 Kopien) und IFN γ (63 ± 32 Kopien) führte in Makrophagen zu einem deutlich, wenn auch nicht signifikant, reduzierten Bakterienwachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (1518 ± 367 Kopien). Durch Zugabe neutralisierender Antikörper wurde dieser Effekt zum Teil wieder aufgehoben.

Diese Daten machen deutlich, dass sowohl TNF α als auch IFN γ die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen steigern und vermutlich für die CD4⁺ T-Zell-vermittelte Eliminierung von *R. typhi* von Bedeutung sind.

4 Ergebnisse

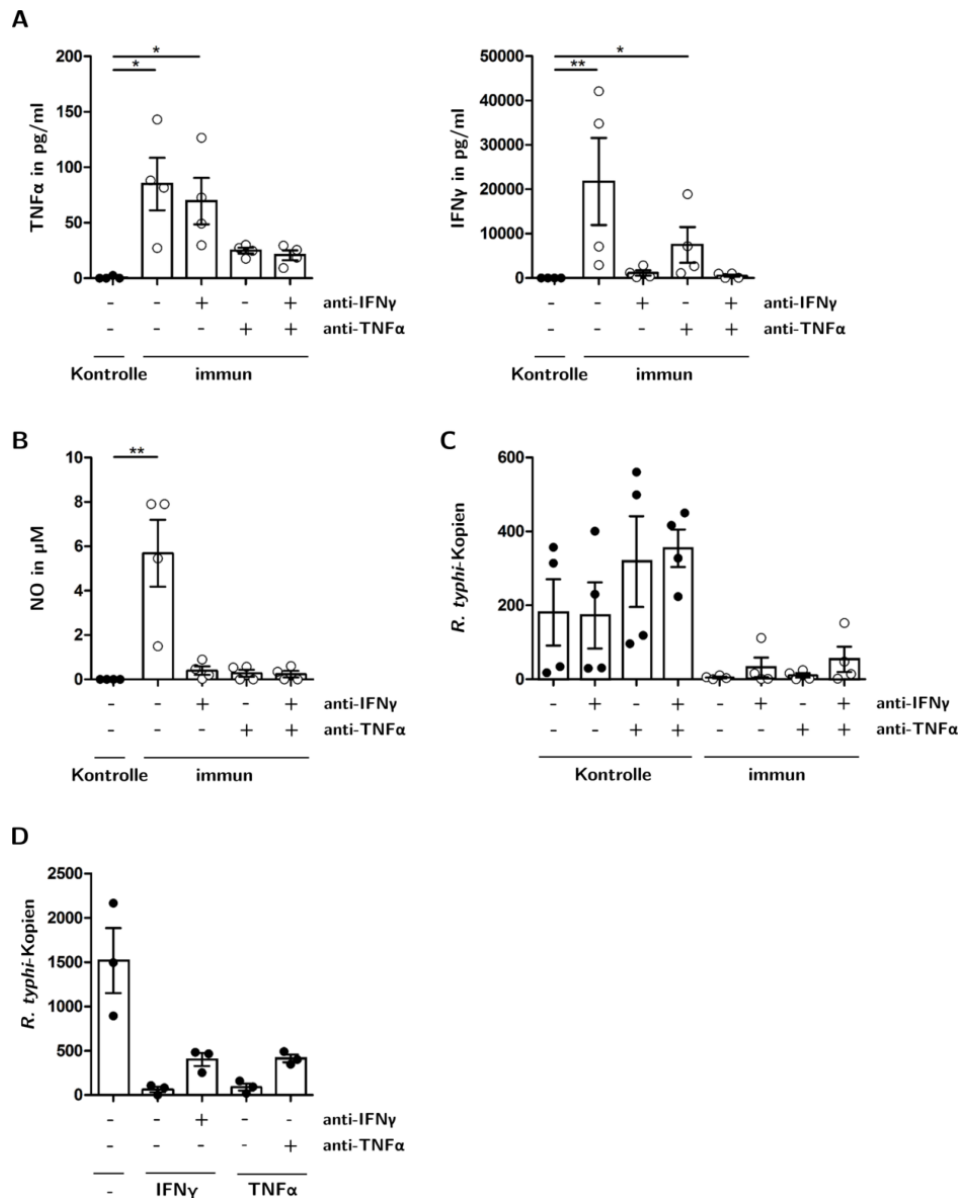


Abbildung 4.33: CD4⁺T-Zellen steigern durch die Freisetzung von TNFα und IFNγ die bakterizide Aktivität von Makrophagen. CD4⁺T-Zellen wurden aus naiven (Kontrolle) oder infizierten BALB/c-Mäusen (7 Tage nach Infektion) isoliert und mit *R. typhi*-infizierten Knochenmarkmakrophagen kokultiviert. TNFα und IFNγ wurden unter Verwendung von Antikörpern (jeweils 10 μg/ml) neutralisiert. Der Erfolg der Neutralisierung wurde im Überstand der Kulturen durchflusszytometrisch analysiert (A). Zur Untersuchung des Einflusses von TNFα und IFNγ auf die Makrophagenaktivität wurde die Freisetzung von NO (B) sowie die Erregerlast in den Makrophagen (C) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte 72 Stunden nach Zugabe der T-Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente mit T-Zellen aus je 4 BALB/c-Mäusen (Mittelwert ± SEM). Zusätzlich wurden *R. typhi*-infizierte Makrophagen mit rekombinantem TNFα (400 U/ml) oder IFNγ (1 U/ml) inkubiert. Die Zytokine wurden durch Antikörper (10 μg/ml) neutralisiert und die Bakterienlast in den Makrophagen 72 Stunden nach Zytokinzugabe mittels qPCR bestimmt (D). Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.3.5 TNF α ist für den Schutz von CB17 SCID-Mäusen durch CD4⁺IFN γ ^{-/-}-T-Zellen nicht erforderlich

Die Beobachtung, dass auch TNF α die bakterizide Aktivität von Makrophagen *in vitro* steigert, ließ die Beteiligung dieses Zytokins bei dem durch CD4⁺IFN γ ^{-/-}-T-Zellen vermittelten Schutz vermuten. Um diese Annahme zu prüfen, wurde TNF α in *R. typhi*-infizierten CB17 SCID-Mäusen nach dem Transfer von CD4⁺IFN γ ^{-/-}-T-Zellen neutralisiert. Kontrollmäuse bekamen PBS anstelle von T-Zellen. Die Neutralisierung von TNF α erfolgte durch die wiederholte Injektion eines Antikörpers. Kontrollgruppen erhielten Isotyp-Antikörper. Der Gesundheitszustand der Mäuse im Infektionsverlauf wurde engmaschig bewertet und protokolliert. Abbildung 4.34 A stellt die Überlebensrate, den klinischen Score und die relative Gewichtsveränderung im Verlauf der Infektion dar. Bei den Kontrollmäusen, die keine T-Zellen erhalten hatten, verursachte die Infektion mit *R. typhi* eine schwere Erkrankung - unabhängig davon, ob sie mit Isotyp- oder anti-TNF α -Antikörper behandelt wurden. Die Tiere verloren stark an Gewicht, entwickelten einen hohen klinischen Score und erlagen der Infektion innerhalb von 20 Tagen. Mäuse, die CD4⁺IFN γ ^{-/-}-T-Zellen transferiert und den Isotyp-Antikörper injiziert bekamen, entwickelten im gleichen Zeitrahmen Symptome wie die Kontrollgruppen. Bei der Mehrzahl der Mäuse war die Erkrankung so schwerwiegend, dass diese von ihrem Leiden erlöst werden mussten. Die verbleibenden Tiere (29 %) erholten sich von der Erkrankung. Unerwarteterweise waren Mäuse, die CD4⁺IFN γ ^{-/-}-T-Zellen in Kombination mit dem TNF α -neutralisierenden Antikörper erhalten hatten, im Vergleich zu den mit Isotyp-Antikörper behandelten besser geschützt. Auch hier traten bei allen Tieren Anzeichen der Erkrankung auf. Diese waren jedoch größtenteils vergleichsweise mild. So ließ sich im Verlauf der Infektion auch ein wesentlich geringerer Gewichtsverlust gegenüber den mit Isotyp-Antikörper behandelten Empfängermäusen nachweisen. Nach Transfer von CD4⁺IFN γ ^{-/-}-T-Zellen und Neutralisierung von TNF α überlebten 5 von 7 Mäuse (71 %).

Bei CB17 SCID-Mäusen kommt es im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion zur Schädigung der Leber [115]. Diese lässt sich durch eine erhöhte GPT-Konzentration im Blut feststellen. Eine Bestimmung der GPT-Konzentration im Serum wurde auch in diesem Experiment durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte entweder zum Todeszeitpunkt oder nach Beendigung des Experiments, am 34. Tag nach Infektion. Abbildung 4.34 B zeigt das Ergebnis dieser Messung. Während sich bei den CB17 SCID-Mäusen, die keine T-Zellen erhalten hatten, erhöhte GPT-Konzentrationen im Serum detektieren ließen ($49,6 \pm 8,7$ U/l), lagen die GPT-Werte nach dem Transfer von CD4⁺IFN γ ^{-/-}-T-Zellen im normalen Bereich ($15,8 \pm 2,9$ U/l). Dies galt auch für Empfängermäuse, die der Infektion erlagen. Ein Einfluss der TNF α -Neutralisation auf die GPT-Konzentration ließ sich nicht erkennen. Im Gegensatz zu den Kontrollmäusen war eine Leberschädigung nach T-Zelltransfer auch makroskopisch nicht ersichtlich. CD4⁺T-Zellen können die Entstehung von Lebernekrosen demnach unabhängig von IFN γ und TNF α verhindern.

4 Ergebnisse

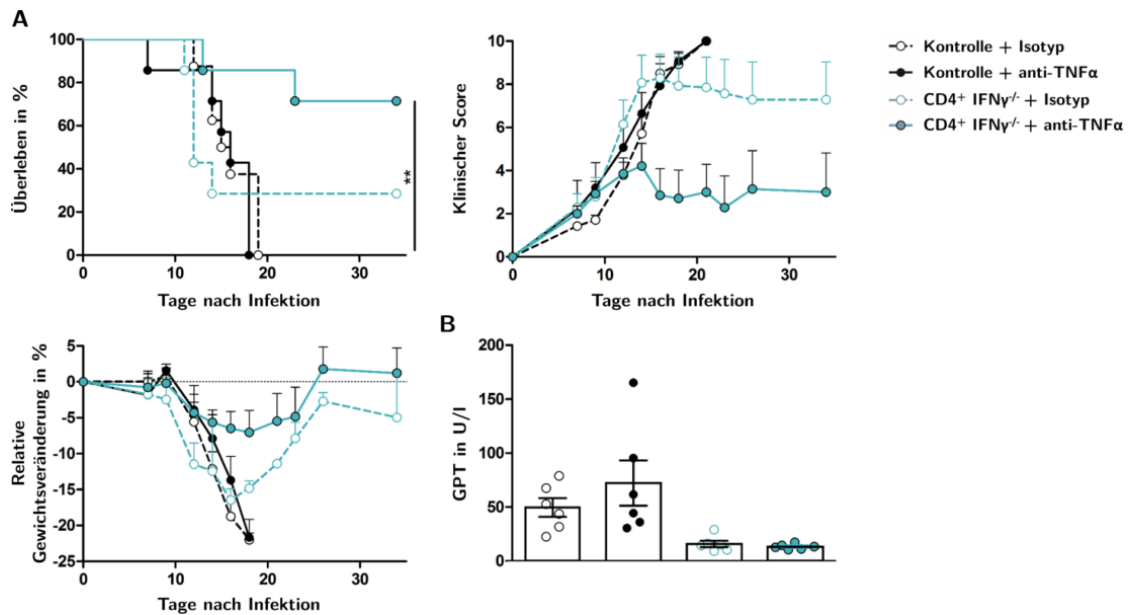


Abbildung 4.34: CD4⁺IFNγ^{-/-}-T-Zellen schützen CB17 SCID-Mäuse unabhängig von TNFα. CD4⁺T-Zellen aus BALB/c IFNγ^{-/-}-Mäusen wurden in CB17 SCID-Mäuse transferiert. Kontrollmäuse erhielten PBS anstelle von T-Zellen. Einen Tag nach T-Zelltransfer bzw. PBS-Injektion wurden die Mäuse mit *R. typhi* infiziert. Im 3-Tages-Rhythmus wurden die Tiere mit anti-TNFα- oder Isotyp-Antikörper (je 500 µg) behandelt. Abgebildet ist die Überlebensrate, der klinische Score sowie die relative Gewichtsveränderung im Infektionsverlauf (A). Die GPT-Konzentration wurde zum Todeszeitpunkt bzw. nach Beendigung des Experiments (34 Tage nach Infektion) im Serum bestimmt (B). Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments (Mittelwert ± SEM, n=7). Der statistische Vergleich der Überlebensraten erfolgte mit Log-Rank-Test (**p<0,01). Bei der Angabe der GPT-Werte entspricht jeder Datenpunkt einem Individuum. Die statistische Analyse wurde mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test durchgeführt.

Im Anschluss wurde geprüft, welche Auswirkung die Neutralisierung von TNFα auf die Eliminierung von *R. typhi* durch CD4⁺IFNγ^{-/-}-T-Zellen hat. Die Erregerlast in Gehirn, Lunge, Leber und Milz wurde zum Todeszeitpunkt bzw. nach Beendigung des Experiments (34 Tage nach Infektion) mittels qPCR bestimmt (Abb. 4.35). Isotyp- und anti-TNFα-behandelte Kontrollgruppen wiesen vergleichbar hohe Erregerlasten in allen Organen auf. In Abwesenheit von T-Zellen hat TNFα damit keinen Einfluss auf die Abwehr der Bakterien. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen ließ sich in den Organen von Mäusen, die CD4⁺ IFNγ^{-/-}-T-Zellen erhalten hatten, unabhängig der Neutralisierung von TNFα, eine signifikant reduzierte Erregerlast detektieren. Eine verminderte Bakterienlast war hierbei nicht nur in den überlebenden Tieren, sondern auch in T-Zellrezipienten feststellbar, die der Infektion erlagen.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass IFNγ-defiziente CD4⁺T-Zellen, unabhängig von TNFα, Schutz vermitteln. TNFα scheint in dieser Situation immunpathologisch zu wirken und einen schwereren Krankheitsverlauf zu fördern.

4 Ergebnisse

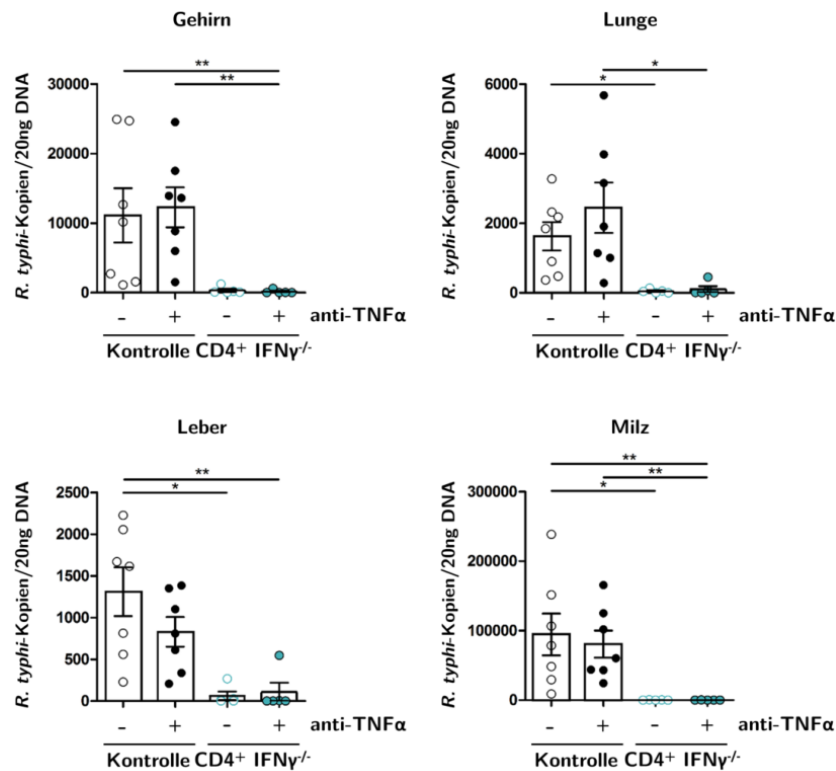


Abbildung 4.35: TNF α ist *in vivo* für die Eliminierung von *R. typhi* durch CD4⁺IFN γ ^{-/-}-T-Zellen nicht von Bedeutung. Isolierte CD4⁺IFN γ ^{-/-}-T-Zellen wurden CB17 SCID-Mäusen intravenös injiziert. Kontrollmäusen wurde PBS anstelle von T-Zellen verabreicht. Am Folgetag wurden die Mäuse mit *R. typhi* infiziert und im Abstand von 3 Tagen mit anti-TNF α - oder Isotyp-Antikörper behandelt. Die Bakterienlast in den aufgeführten Organen wurde zum Todeszeitpunkt bzw. nach Beendigung des Experiments (34 Tage nach Infektion) mittels qPCR bestimmt. Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.3.6 IFN γ -defiziente CD4⁺T-Zellen differenzieren in der *R. typhi*-Infektion zu T_H17-Zellen, die IL-17, IL-22 und TNF α produzieren

Dass TNF α nicht nur für den Schutz durch IFN γ -defiziente CD4⁺T-Zellen entbehrlich ist, sondern sogar zu einer schwereren Erkrankung führt, war überraschend. Immune CD4⁺T-Zellen aus BALB/c Wildtyp-Mäusen produzierten neben IFN γ und TNF α keine weiteren Effektorzytokine. Es stellte sich daher die Frage, welche Mediatoren neben TNF α von immunen CD4⁺ IFN γ ^{-/-}-T-Zellen freigesetzt werden und das Defizit kompensieren. Um der Antwort näher zu kommen, wurde das Zytokinprofil von immunen CD4⁺T-Zellen mit dem von CD4⁺ IFN γ ^{-/-}-T-Zellen verglichen. Hierfür wurden CD4⁺T-Zellen aus naiven oder infizierten BALB/c- und BALB/c IFN γ ^{-/-}-Mäusen isoliert und mit infizierten Knochenmarkmakrophagen inkubiert. Nach 72 Stunden Kokultur wurde die Konzentration verschiedener Zytokine im Überstand analysiert (Abb. 4.36). Wie zuvor beobachtet, setzten immune CD4⁺T-Zellen aus BALB/c-

4 Ergebnisse

Mäusen nach Antigenerkennung vermehrt T_H1 -Zytokine wie $IFN\gamma$ ($21749,3 \pm 9799,0$ pg/ml), $TNF\alpha$ ($85,0 \pm 23,7$ pg/ml) und IL-2 ($1213,2 \pm 104,0$ pg/ml) frei. In geringen Konzentrationen waren in den Überständen dieser T-Zellen auch IL-6 ($10,7 \pm 3,1$ pg/ml), IL-10 ($82,2 \pm 31,2$ pg/ml) und IL-22 ($10,4 \pm 3,7$ pg/ml) nachweisbar. T_H2 -Zytokine wie IL-4 und IL-13 ließen sich nicht detektieren. Im Gegensatz zu immunen $CD4^+T$ -Zellen aus BALB/c Wildtyp-Mäusen produzierten immune $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen, neben vergleichbaren Mengen $TNF\alpha$ ($56,7 \pm 19,6$ pg/ml) und IL-2 ($1406,8 \pm 313,5$ pg/ml), T_H17 -assoziierte Zytokine. In den Überständen der $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen konnten hohe Konzentrationen IL-17A ($3060,6 \pm 1586,7$ pg/ml) und IL-22 ($1126,7 \pm 401,7$ pg/ml) sowie geringe Mengen IL-17F ($17,8 \pm 2,3$ pg/ml) nachgewiesen werden. Des Weiteren synthetisierten immune $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen nach Antigenerkennung geringe Mengen des T_H2 -Zytokins IL-13 ($41,1 \pm 16,8$ pg/ml). IL-4 ließ sich in den Überständen nicht detektieren.

Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion überwiegend zu T_H17 -Zellen differenzieren.

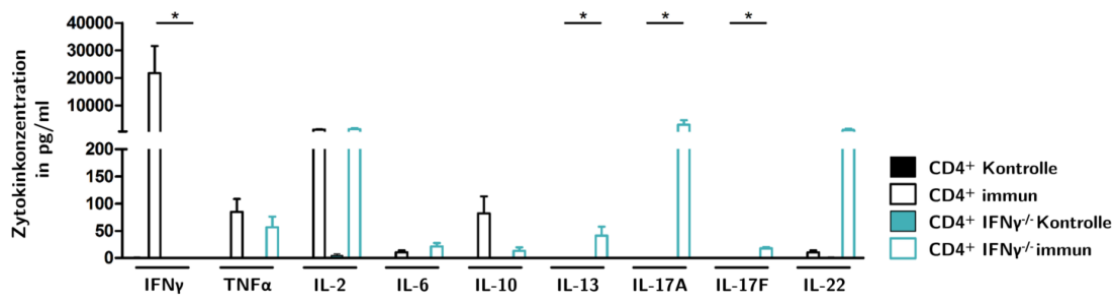


Abbildung 4.36: $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen produzieren nach *R. typhi*-spezifischer Restimulation vermehrt T_H17 -Zytokine. $CD4^+$ -T-Zellen wurden aus naiven und infizierten BALB/c- bzw. BALB/c $IFN\gamma^{-/-}$ -Mäusen isoliert und mit *R. typhi*-infizierten Knochenmarkmakrophagen kultiviert. Nach 72-stündiger Inkubation wurden die Zytokinkonzentrationen im Überstand unter Verwendung eines Bead-basierten Immunassays analysiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments (Mittelwert $\pm$ SEM, $n=4$). Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* $p<0,05$).

4.3.7 $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen schützen CB17 SCID-Mäuse auch in Abwesenheit von IL-17

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen nach Antigenerkennung *in vitro* einen T_H17 -Phänotyp annehmen. $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen produzieren vermehrt IL-17A und IL-22. Neben IL-17A, IL-22 und $TNF\alpha$ setzen $IFN\gamma$ -defiziente $CD4^+T$ -Zellen keine weiteren Effektoren in nennenswerten Mengen frei. Dies führte zur Vermutung, dass IL-17 und IL-22 eine schützende Funktion zukommt. Die Bedeutung von IL-17 für die $IFN\gamma$ -unabhängige Vermittlung von Schutz wurden in einem *in-vivo*-Neutralisationsexperiment untersucht. Hierfür wurden $CD4^+T$ -Zellen aus BALB/c $IFN\gamma^{-/-}$ -Mäusen isoliert und in CB17 SCID-Mäuse transferiert. Den Kontrollmäusen wurde PBS anstelle von T-Zellen verabreicht.

4 Ergebnisse

Am darauffolgenden Tag erfolgte die Infektion mit *R. typhi*, und die Mäuse wurden im 2-Tages-Rhythmus mit anti-IL17- oder Isotyp-Antikörper behandelt. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde regelmäßig über einen Zeitraum von 26 Tagen bewertet. Die erhobenen Daten sind in Abbildung 4.37 graphisch veranschaulicht. Wie erwartet, verstarben Kontrollmäuse, die keine T-Zellen erhalten hatten und mit Isotyp-Antikörper behandelt wurden, in Folge der *R. typhi*-Infektion. Im Gegensatz dazu überlebten alle Mäuse, die $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen in Kombination mit dem anti-IL-17-Antikörper erhalten hatten. Überraschenderweise entwickelten diese Tiere nur milde Symptome der Erkrankung und verloren kaum an Gewicht. Im Vergleich dazu zeigten Isotyp-behandelte Empfänger-mäuse zwischen dem 14. und 21. Tag nach Infektion deutliche Krankheitssymptome sowie einen ausgeprägten Gewichtsverlust. Eine Maus der Gruppe erlag der Infektion. Der höchste Score und Gewichtsverlust war bei diesen Tieren am 16. Tag nach Infektion zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt waren anti-IL-17-behandelte Empfänger-mäuse bereits symptomfrei.

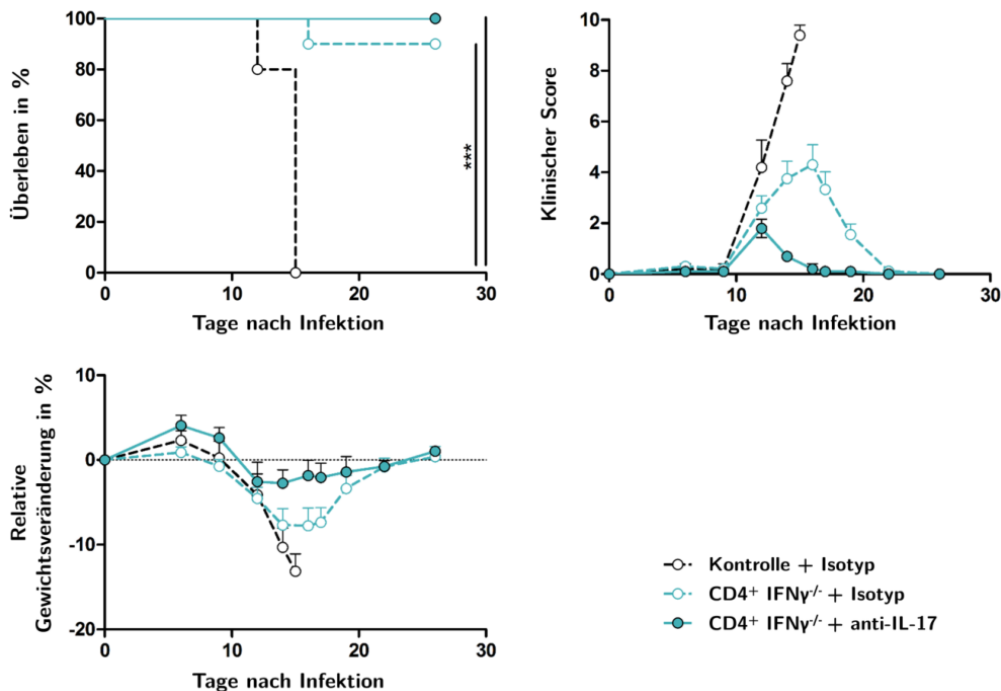


Abbildung 4.37: $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen schützen *R. typhi*-infizierte CB17 SCID-Mäuse auch in Abwesenheit von IL-17. $CD4^+$ -T-Zellen aus BALB/c $IFN\gamma^{-/-}$ -Mäusen wurden in CB17 SCID-Mäuse transferiert. Kontrollmäusen wurde anstatt dessen PBS intravenös injiziert. Am Folgetag wurden die Mäuse mit *R. typhi* infiziert und im 2-Tages-Rhythmus mit anti-IL-17- oder Isotyp-Antikörper behandelt. Nach *R. typhi*-Infektion wurde der Gesundheitszustand der Mäuse engmaschig kontrolliert. Gezeigt ist die Überlebensrate, der klinische Score sowie die relative Gewichtsveränderung im Infektionsverlauf. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments (Mittelwert $\pm$ SEM, Kontrolle + Isotyp, n=5; $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ + Isotyp / anti-IL-17, n=10). Der statistische Vergleich der Überlebensraten erfolgte mit Log-Rank-Test (***) $p < 0,001$.

Inwieweit $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen auch in der Lage sind, *R. typhi* in Abwesenheit von IL-17 zu eliminieren, wurde mittels qPCR untersucht. Die Bakterienlast in Gehirn, Lunge, Leber und

4 Ergebnisse

Milz wurde zum Todeszeitpunkt bzw. nach Beendigung des Experiments (26 Tage nach Infektion) bestimmt (Abb. 4.38). Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keine T-Zellen erhalten hatte, wurde nach Transfer von $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen eine signifikant reduzierte Erregerlast in allen Organen beobachtet. Im Generellen war *R. typhi* nur in 5 von 10 Mäusen nachweisbar, die $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen in Kombination mit dem Isotyp-Antikörper erhalten hatten. Darin inbegriffen die Maus, die der Infektion trotz des T-Zelltransfers erlag. Die Bakterien ließen sich in sehr geringer Anzahl vorwiegend im Gehirn detektieren. Nach Transfer von $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen und Neutralisation von IL-17 konnte *R. typhi* nur in 3 von 10 Mäusen im Gehirn nachgewiesen werden ($3,4 \pm 2,1$ Kopien/ 20 ng DNA). In der Lunge, Leber und Milz waren die Bakterien nicht detektierbar.

Diese Daten zeigen, dass $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen *R. typhi*-infizierte CB17 SCID-Mäuse unabhängig von IL-17 schützen und die Bakterien eliminieren. Ähnlich wie $TNF\alpha$ scheint IL-17 pathologische Effekte zu besitzen, die zu einem schwereren Krankheitsverlauf führen können.

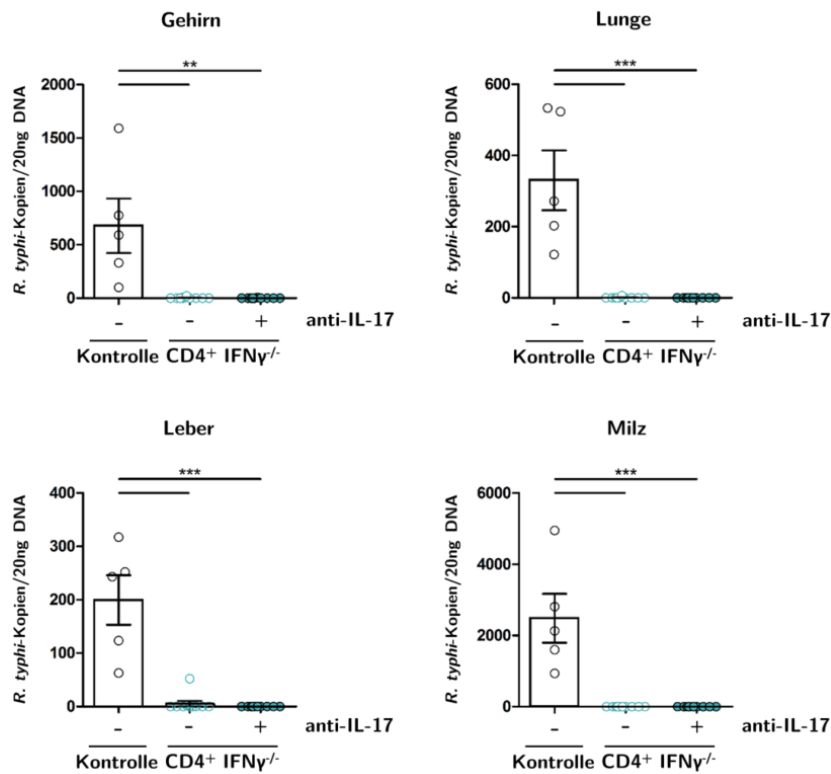


Abbildung 4.38: Für die Eliminierung von *R. typhi* durch $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen wird IL-17 nicht benötigt. $CD4^+IFN\gamma^{-/-}$ -T-Zellen wurden CB17 SCID-Mäusen in die laterale Schwanzvene injiziert. Kontrollmäuse erhielten PBS anstelle von T-Zellen. Einen Tag nach T-Zelltransfer bzw. PBS-Injektion wurden die Mäuse mit *R. typhi* infiziert. Im 2-Tages-Rhythmus erfolgte die Gabe von anti-IL17- oder Isotyp-Antikörper. Die Bakterienlast wurde mittels qPCR zum Todeszeitpunkt bzw. nach Beendigung des Experiments (26 Tage nach Infektion) ermittelt. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments (Mittelwert $\pm$ SEM). Jeder Datenpunkt entspricht einem Individuum. Die statistische Analyse erfolgte mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's post Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die T-Zellantwort und ihre Bedeutung für den Schutz gegenüber *R. typhi* untersucht. Hierbei wurden erstmals die funktionellen Voraussetzungen für den T-Zell-vermittelten Schutz charakterisiert. Wildtyp-Mäuse induzieren im Verlauf der *R. typhi*-Infektion eine zytotoxische CD8⁺T-Zellantwort sowie eine CD4⁺T_H1-Antwort, die durch die Freisetzung von IFN γ und TNF α geprägt ist. Sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺T-Zellen schützen immundefiziente Mäuse vor dem tödlichen Verlauf einer *R. typhi*-Infektion. Die Perforin-vermittelte Zytotoxizität der CD8⁺T-Zellen ist für den Schutz nicht erforderlich. Überraschenderweise schützen nicht nur CD4⁺T_H1-Zellen, sondern auch IFN γ -defiziente CD4⁺T_H17-Zellen. Diese produzieren in der *R. typhi*-Infektion neben TNF α IL-17A und IL-22. Die Neutralisation von TNF α oder IL-17A führt zu einem mildereren Krankheitsverlauf und einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit. In Kombination wirken TNF α und IL-17 demnach immunpathologisch. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse dieser Arbeit im Abgleich mit der Literatur diskutiert.

5.1 Adaptive Immunmechanismen sind für die Abwehr von Rickettsien-Infektionen essenziell

Rickettsien sind obligat intrazelluläre Bakterien, die sich primär in Endothelzellen vermehren [106]. Als weitere wichtige Zielzellen werden Monozyten und Makrophagen angesehen [32–35], deren eigentliche Aufgabe die Aufnahme und Eliminierung von Pathogenen ist. Ohne adaptive Immunmechanismen gelingt die Beseitigung der Bakterien jedoch nicht. Die Bedeutung des adaptiven Immunsystems bei der Bekämpfung von *R. typhi* wird deutlich, wenn man den Infektionsverlauf bei T- und B-Zell-defizienten Mäusen betrachtet. Während die Infektion bei C57BL/6 und BALB/c Wildtyp-Mäusen keine Symptome verursacht, versterben T- und B-Zell-defiziente Mäuse. C57BL/6 RAG1^{-/-}- und CB17 SCID-Mäuse weisen dabei verschiedene Krankheitsbilder auf. Monate nach einer *R. typhi*-Infektion entwickeln C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse eine hohe Bakterienlast im Gehirn und eine damit einhergehende Gehirnentzündung, die zu neurologischen Störungen, motorischen Ausfällen und Lähmungen führt [114]. CB17 SCID-Mäuse, die auf dem genetischen BALB/c-Hintergrund gezüchtet sind, versterben dagegen bereits innerhalb von 3 Wochen. Diese Mäuse zeigen eine hohe Bakterienlast in allen Organen, insbesondere der Milz, entwickeln eine Splenomegalie, einen schwe-

ren Leberschaden sowie eine hohe systemische Inflammation, die letztlich zum Tod der Tiere führt [115]. Ursache für das Fehlen von T- und B-Zellen in CB17 SCID-Mäusen ist eine spontane Mutation im Gen, das für die DNA-abhängige Proteinkinase kodiert. Dieses DNA-Reparaturenzym ist nicht nur für die Rekombination des T- und B-Zellrezeptors wichtig, sondern hat ebenfalls Einfluss auf weitere Prozesse. Um auszuschließen, dass die Erkrankung in diesen Mäusen tatsächlich auf das Fehlen des adaptiven Immunsystems zurückzuführen und nicht durch andere Auswirkungen des Gendefekts bedingt ist, wurden BALB/c RAG2^{-/-}-Mäuse mit *R. typhi* infiziert. BALB/c RAG2^{-/-}-Mäuse erkrankten im gleichen Zeitraum wie CB17 SCID-Mäuse und zeigten dieselben Symptome. Demnach ist das Fehlen des adaptiven Immunsystems Ursache für die Suszeptibilität sowohl der BALB/c RAG2^{-/-}- als auch der CB17 SCID-Mäuse. Zudem belegen diese Daten, dass der unterschiedliche Infektionsverlauf in C57BL/6 RAG1^{-/-}- und CB17 SCID- bzw. BALB/c RAG2^{-/-}-Mäusen dem genetischen Hintergrund geschuldet ist.

Sowohl C57BL/6 RAG1^{-/-}- als auch CB17 SCID- und BALB/c RAG2^{-/-}-Mäusen fehlen neben funktionellen T-Zellen auch B-Zellen. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass die B-Zellantwort bei der Infektion mit Rickettsien eine untergeordnete Rolle spielt. So trägt der Transfer immuner Milzzellen, aber nicht der immuner Antikörper-haltiger Seren, zur Wachstumskontrolle von *R. typhi* in Meerschweinchen bei [188]. Athymische BALB/c-Mäuse, die zwar Antikörper-produzierende B-Zellen, jedoch keine funktionellen T-Zellen besitzen, versterben infolge einer Infektion mit *R. akari*. Auch der passive Transfer von Antikörpern kann diese Mäuse nicht vor dem tödlichen Verlauf der *R. akari*-Infektion schützen [150]. Während die von B-Zellen sekretierten Antikörper vermutlich keine große Rolle bei der Abwehr einer Primärinfektion mit Rickettsien spielen, sind T-Zellen für die Bekämpfung der Bakterien zwingend erforderlich. Die Bedeutung der verschiedenen T-Zellpopulationen für den Schutz gegenüber *R. typhi* sowie die hierfür benötigten Effektorfunktionen werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

5.2 CD8⁺T-Zellen vermitteln einen effektiven und langanhaltenden Schutz gegenüber *R. typhi*

Die bedeutende Rolle von zytotoxischen T-Zellen bei der Bekämpfung von Rickettsien wurde bereits in den 80er Jahren vermutet. Grund diese Annahme war, dass die Zugabe isolierter Milzzellen aus *R. typhi*- und *O. tsutsugamushi*-infizierten Mäusen zur spezifischen Lyse von Gewebekulturzellen führte, die mit den gleichen Erregern infiziert waren [189]. Eine effektive zytotoxische T-Zellantwort setzt die Antigen-spezifische Aktivierung von CD8⁺T-Zellen voraus. Dies resultiert in der Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen, die im Rahmen einer Infektion häufig zu einem nachweisbaren Anstieg der T-Zellzahl führt. So ließ sich bei C3H/HeN-Mäusen infolge einer *R. conorii*-Infektion eine Expansion und Infiltra-

tion von CD8⁺T-Zellen in der Milz und Leber beobachten [163]. Eine steigende Anzahl an CD8⁺T-Zellen war zudem in der Milz und Lunge von *O. tsutsugamushi*-infizierten BALB/c-Mäusen detektierbar [190]. Im Verlauf einer Infektion mit *R. typhi* wurde eine generelle Zunahme von CD8⁺ T-Zellen weder in C57BL/6- noch in BALB/c-Mäusen festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise nur wenige spezifische CD8⁺ T-Zellklone entstehen, deren Expansion im gesamten CD8⁺ T-Zellpool nicht nachweisbar ist. Eine Analyse der Expression von KLRG1, einem Marker für CD8⁺Effektorzellen [174], und CD11a, einem Marker für Antigen-erfahrener CD8⁺T-Zellen [173], zeigte jedoch einen Anstieg Antigen-erfahrener CD8⁺T-Effektorzellen im Infektionsverlauf. Ein signifikant erhöhter Anteil Antigen-erfahrener CD8⁺T-Zellen war am 7. Tag nach Infektion sowohl in C57BL/6- als auch in BALB/c-Mäusen detektierbar. Mit dem Anstieg Antigen-erfahrener CD8⁺T-Zellen korrelierte auch die Expression der Effektormoleküle IFN γ und Granzym B. In C57BL/6- und BALB/c-Mäusen ließ sich am 7. Tag nach Infektion der größte Anteil IFN γ - und Granzym B-produzierender CD8⁺T-Zellen nachweisen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Beobachtungen, die bereits in *R. typhi*-infizierten C3H/HeN-Mäusen gemacht wurden. Dort erreichte die Aktivität der CD8⁺T-Zellen ihr Maximum ebenfalls am 7. Tag nach Infektion und korrelierte mit dem Beginn der Eliminierung der Rickettsien [191]. Die Frequenz der IFN γ -Produzenten war zu diesem Infektionszeitpunkt in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen vergleichbar hoch, während der Anteil Granzym B-exprimierender CD8⁺T-Zellen in BALB/c-Mäusen um die Hälfte geringer war als in C57BL/6-Mäusen. Granzym B ist für die zytotoxische Aktivität von CD8⁺T-Zellen von entscheidender Bedeutung [192]. Diese Ergebnisse sind daher ein Indiz dafür, dass die Induktion zytotoxischer CD8⁺T-Zellen in BALB/c-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen weniger effizient ist. Ähnliche Beobachtungen wurden u. a. bei der Infektion mit *Leishmania major* gemacht [193]. Weitere Unterschiede hinsichtlich der CD8⁺ T-Zellantwort zeigten sich bei C57BL/6- und BALB/c-Mäusen auch im Verlauf der Infektion. In C57BL/6-Mäusen nahm der Anteil an CD8⁺T-Effektorzellen, die IFN γ und Granzym B exprimierten, ab dem 14. Tag nach Infektion wieder ab, blieb jedoch bis zum 35. Tag konstant über dem Ausgangsniveau. Im Gegensatz dazu wurde in BALB/c-Mäusen ein zweites Maximum der CD8⁺ T-Zellantwort am 35. Tag nach Infektion beobachtet. Dies deutet auf einen anhaltenden oder repetitiven Antigenkontakt hin, der in BALB/c-Mäusen zu einer Reaktivierung der T-Zellen führt. Die Beobachtungen stehen im Einklang mit der Erkenntnis, dass *R. typhi* in BALB/c- und C57BL/6-Mäusen persistiert [114] und lassen vermuten, dass ein permanentes Niveau aktivierter CD8⁺T-Zellen oder eine regelmäßige Reaktivierung von CD8⁺T-Zellen für die Kontrolle der persistierenden Bakterien notwendig ist. Die Persistenz von *R. typhi* in C3H/HeN-Mäusen wurde bislang nicht belegt. In diesen Mäusen lässt sich nach *R. typhi*-Infektion jedoch ebenfalls eine anhaltende CD8⁺T-Zellantwort nachweisen. Die Anzahl der IFN γ -produzierenden CD8⁺T-Zellen kehrte in C3H/HeN-Mäusen bis zum 60. Tag nach Infektion nicht auf das Ausgangsniveau zurück [191]. Wahrscheinlich besteht auch hier ein Zusammenhang

5 Diskussion

zwischen der anhaltenden Immunantwort und einer unvollständigen Eliminierung der Bakterien.

CD8⁺T-Zellen sind bei der Abwehr von *R. typhi* in C3H/HeN-Mäusen von großer Bedeutung. Eine Depletion dieser T-Zellpopulation war in C3H/HeN-Mäusen mit einer deutlich erhöhten Bakterienlast und Sterblichkeit verbunden [106]. In Abwesenheit von CD8⁺T-Zellen erlagen 93 % der Mäuse einer gewöhnlich subletalen Dosis *R. typhi*. Ebenso führte die Depletion von CD8⁺T-Zellen zum Tod von 71 % *R. conorii*-infizierter C3H/HeN-Mäuse bei einer normalerweise subletalen Dosis [163]. In *O. tsutsugamushi*-infizierten BALB/c-Mäusen sind CD8⁺T-Zellen für die Limitierung des Bakterienwachstums erforderlich [190]. Bei C57BL/6 MHCII^{-/-}-Mäusen, die keine CD8⁺T-Zellen besitzen [178, 179], war die tödliche Dosis von *R. australis*, verglichen mit C57BL/6 Wildtyp-Mäusen, 50.000-mal geringer [165]. Es war daher überraschend, dass C57BL/6 MHCII^{-/-}-Mäuse nach *R. typhi*-Infektion zu keinem Zeitpunkt Anzeichen einer Erkrankung zeigten und die Infektion über einen Zeitraum von 150 Tagen überlebten. Wie C57BL/6 MHCII^{-/-}-Mäuse waren jedoch auch C57BL/6 MHCI^{-/-}-Mäuse, die CD8⁺ aber keine CD4⁺T-Zellen besitzen [180, 181], gegenüber *R. typhi* geschützt und entwickelten keine Symptome. Initial vorhandene CD8⁺T-Zellen, aber auch CD4⁺T-Zellen, sind demnach in der Lage, Schutz gegenüber *R. typhi* zu vermitteln. Dieses Ergebnis deutet auf mögliche Unterschiede zwischen der Abwehr von Fleckfieber-Rickettsien, zu denen *R. typhi* zählt, und Rickettsien anderer Gruppen hin, für deren Abwehr die CD8⁺ T-Zellantwort offenbar wichtiger ist.

Um die schützende Funktion von CD8⁺T-Zellen zu prüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob ein Transfer dieser T-Zellen den letalen Ausgang einer *R. typhi*-Infektion in T- und B-Zell-defizienten Mäusen verhindert und zur Eliminierung der Bakterien führt. Hierfür wurden C57BL/6 RAG1^{-/-}- und CB17 SCID-Mäuse verwendet, die sich hinsichtlich des Infektionsverlaufs und der Pathologie stark voneinander unterscheiden. C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse sind in der Lage, *R. typhi* über einen langen Zeitraum zu kontrollieren, bevor sich die Bakterien vornehmlich im Gehirn vermehren und eine letale Entzündung des ZNS hervorrufen [114]. Da sich *R. typhi* bei diesen Mäusen erst etwa 60 Tage nach Infektion nachweisen lässt, ist die Antigenkonzentration über lange Zeit vermutlich zu gering, um zeitnah eine effiziente T-Zellantwort auszulösen. In C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse wurden daher immune anstatt naive CD8⁺T-Zellen transferiert. Der Transfer erfolgte zu verschiedenen Infektionszeitpunkten (Tag 45, 55, 63), um die Reaktion der CD8⁺T-Zellen sowie die Bakterienlast untersuchen zu können. CD8⁺T-Zellen aus *R. typhi*-infizierten C57BL/6-Mäusen schützten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse vor dem tödlichen Verlauf einer bereits etablierten Infektion. Ein Schutz durch CD8⁺T-Zellen wurde selbst dann vermittelt, wenn die Zellen am 63. Tag und damit zu einem Infektionszeitpunkt transferiert wurden, an dem die Bakterien bereits im Gehirn expandieren. Der Transfer immuner CD8⁺T-Zellen führte zu einer effizienten Eliminierung von *R. typhi* in C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen. Bereits 7 Tage nach dem T-Zelltransfer konnte *R. typhi* bei nur

5 Diskussion

noch 40 % der Empfänger-mäuse in geringer Anzahl detektiert werden. Auch im Gehirn, dem Organ mit der höchsten Erregerlast in C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen [114], waren die Bakterien zu diesem Zeitpunkt kaum noch nachweisbar.

Sowohl durchflusszytometrische als auch immunhistologische Untersuchungen belegten, dass die transferierten CD8⁺T-Zellen in das Gehirn infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse migrieren. Infiltrierte CD8⁺T-Zellen ließen sich 7 Tage nach dem Transfer im Gehirn der Empfänger-mäuse nachweisen, die ebenfalls eine geringe Erregerlast aufwiesen. In den übrigen Mäusen waren die T-Zellen im Gehirn nicht detektierbar. In Mäusen, in denen die Bakterien bereits eliminiert wurden, war die Immunantwort daher vermutlich bereits rückläufig. Im Gegensatz dazu deutet der Nachweis von CD8⁺T-Zellen im Gehirn auf eine anhaltende Immunantwort hin. Eine systemische Reaktion durch den Transfer von CD8⁺T-Zellen ließ sich nicht nachweisen. Am 7. Tag nach dem Transfer waren keine erhöhten Zytokinkonzentrationen im Serum der Empfänger-mäuse messbar.

Ein adoptiver Transfer von CD8⁺T-Zellen konnte auch bei CB17 SCID-Mäusen das Auftreten einer *R. typhi*-bedingten Erkrankung verhindern. Bei diesen T-Zelltransferexperimenten wurden naive CD8⁺T-Zellen aus BALB/c-Mäusen einen Tag vor *R. typhi*-Infektion in CB17 SCID-Mäuse transferiert. Ein Transfer von CD8⁺T-Zellen führte zu einem vollständigen Schutz der Mäuse und zu einer raschen Eliminierung der Bakterien. Bereits 7 Tage nach der Infektion konnte eine deutlich reduzierte Erregerlast in Mäusen festgestellt werden, die CD8⁺T-Zellen erhalten hatten. Der CD8⁺T-Zell-vermittelte Schutz war *R. typhi*-spezifisch und nicht auf Begleiterscheinungen, wie einem kurzfristigen Anstieg der Zytokinproduktion nach T-Zelltransfer, zurückzuführen. Dies bewies ein Experiment, bei dem die CD8⁺T-Zellen nicht einen, sondern 14 Tage vor der Infektion transferiert wurden. Die veränderte Durchführung des Experiments hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis. Dass ein Transfer von CD8⁺T-Zellen Schutz vermittelt, wurde ebenfalls in *R. conorii*-infizierten C3H/HeN-Mäusen beobachtet. C3H/HeN-Mäuse besitzen zwar T- und B-Zellen, sind jedoch suszeptibel gegenüber der Infektion mit verschiedenen Rickettsienarten [105, 106]. Ein Transfer immuner CD8⁺T-Zellen schützte C3H/HeN-Mäuse vor einer normalerweise letalen *R. conorii*-Dosis. Im Gegensatz zum Transfer von CD8⁺T-Zellen in CB17 SCID-Mäuse, vermittelten naive CD8⁺T-Zellen in diesem Modell keinen Schutz [163]. Eine Studie mit *O. tsutsugamushi* belegte ebenfalls die protektive Wirkung eines Transfers immuner CD8⁺T-Zellen [190]. BALB/c-Mäuse, die immune CD8⁺T-Zellen erhalten hatten, besaßen eine signifikant höhere Überlebensrate nach *O. tsutsugamushi*-Infektion. Wie bei einem Transfer in C57BL/6 RAG1^{-/-}- und CB17 SCID-Mäuse, zeigte sich auch hier eine effiziente Eliminierung der Bakterien durch die transferierten CD8⁺T-Zellen.

Die durchgeführten Studien belegen, dass CD8⁺T-Zellen sowohl C57BL/6 RAG1^{-/-}- als auch CB17 SCID-Mäuse vor einer *R. typhi*-bedingten Erkrankung schützen. CD8⁺T-Zellen allein sind ausreichend, um die Bakterien effizient zu eliminieren und einen 100 %igen Schutz zu

erzielen.

5.3 CD4⁺T-Zellen vermitteln ebenfalls Schutz gegenüber *R. typhi*

Neben CD8⁺T-Zellen sind auch CD4⁺T-Zellen in der Lage, vor einer *R. typhi*-bedingten Erkrankung zu schützen. Infizierte C57BL/6 MHCII^{-/-}-Mäuse, die über funktionelle CD4⁺ T-Zellen, aber nicht über CD8⁺T-Zellen verfügen [178, 179], zeigten zu keinem Zeitpunkt Symptome einer Erkrankung und überlebten eine Infektion mit *R. typhi*. Dieses Ergebnis war überraschend, da CD8⁺T-Zellen eine weit wichtigere Rolle bei der Beseitigung von Rickettsien zugeschrieben wird. Die CD4⁺T-Zellantwort wurde daraufhin eingehend charakterisiert. Eine gesteigerte Proliferation von CD4⁺T-Zellen im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion ließ sich in der Milz von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nicht nachweisen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *O. tsutsugamushi* gemacht [190]. Auch hier blieb der Anteil an CD4⁺T-Zellen während der Infektion konstant. In C57BL/6- und BALB/c-Mäusen wird im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion eine T_H1-gerichtete Immunantwort eingeleitet. Diese zeichnet sich durch eine Zunahme der IFN γ -Produzenten innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation und eine erhöhte Freisetzung von IFN γ und TNF α nach *in vitro* Restimulation aus. Ein signifikanter Anstieg IFN γ -exprimierender CD4⁺T-Zellen wurde bei C57BL/6- und BALB/c-Mäusen am 7. Tag nach *R. typhi*-Infektion gemessen. Generell korrelierte die Kinetik der Aktivierung von CD4⁺T-Zellen mit der von CD8⁺T-Zellen. Unterschiede bezüglich der T-Zellaktivität wurden auch hier zwischen C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beobachtet. Während der Anteil IFN γ -produzierender CD4⁺T-Zellen bei C57BL/6-Mäusen im Infektionsverlauf wieder abnahm, war bei BALB/c-Mäusen ein weiteres Maximum am 35. Tag nach *R. typhi*-Infektion detektierbar. Diese Daten lassen auf eine wiederholte Aktivierung der CD4⁺T-Zellen zur Kontrolle persistierender Rickettsien schließen. Eine Reaktivierung von CD4⁺T-Zellen wurde bei C57BL/6-Mäusen nicht festgestellt. Dennoch ließ sich in diesen Mäusen zu einem späten Zeitpunkt der Infektion ein leicht erhöhter Anteil aktivierter CD4⁺T-Zellen nachweisen. Ähnlich wie die CD8⁺T-Zellantwort scheint auch die CD4⁺T-Zellantwort im Verlauf der *R. typhi*-Infektion bei BALB/c-Mäusen weniger effizient zu sein als bei C57BL/6-Mäusen. Im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen waren in BALB/c-Mäusen 7 Tage nach *R. typhi*-Infektion nur etwa halb so viele IFN γ -produzierende CD4⁺T-Zellen detektierbar (6 % statt 14 %). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass BALB/c-Mäuse gegenüber C57BL/6-Mäusen generell eine schwächere T_H1-Antwort ausbilden [172]. Entsprechende Beschreibungen finden sich ebenfalls für die Infektion mit anderen intrazellulären Erregern wie *Leishmania major* [193] und *Yersinia enterocolitica* [194].

Für die Vermittlung von Schutz in *R. typhi*-infizierten C57BL/6- und BALB/c-Mäusen sind CD4⁺T-Zellen nicht essenziell. Das bestätigte zum einen der Transfer von CD8⁺T-Zellen in

5 Diskussion

C57BL/6 RAG1^{-/-}- und CB17 SCID-Mäuse, der in Abwesenheit von CD4⁺T-Zellen zu einem 100 %igen Schutz führte, und zum anderen die Infektion von C57BL/6 MHCII^{-/-}-Mäusen. C57BL/6 MHCII^{-/-}-Mäuse, die nicht in der Lage sind funktionelle CD4⁺T-Zellen auszubilden [180, 181], zeigten zu keinem Zeitpunkt Symptome und überlebten die *R. typhi*-Infektion. Auch für die Abwehr von *R. conorii* sind CD4⁺T-Zellen für den Schutz nicht zwingend erforderlich. Die Infektion von C3H/HeN-Mäusen mit einer subletalen Dosis *R. conorii* nahm nach Depletion von CD4⁺T-Zellen den gleichen Verlauf wie bei nichtdepletierten Tieren. Die Mäuse waren in der Lage die Bakterien zu eliminieren und erholten sich von der Erkrankung [163]. Auch bei anderen Infektionen mit intrazellulären Erregern sind CD8⁺T-Zellen für die Abwehr von größerer Relevanz, da sie infizierte Zellen direkt abtöten können. Beispiele hierfür sind Infektionen mit Plasmodien [195] und Listerien [196]. Es gibt aber auch gegenteilige Beobachtungen, beispielsweise für die Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *Chlamydia (C.) trachomatis*. Hier führte eine Depletion von CD4⁺T-Zellen bei der Infektion von BALB/c^{nu/+}-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der Bakterienlast und einer verminderten Überlebenswahrscheinlichkeit [197]. CD4⁺T-Zellen kommt bei der Abwehr von *C. trachomatis* sogar eine entscheidendere Rolle zu als CD8⁺T-Zellen [197, 198]. Bei der Infektion von Mäusen mit *R. typhi* können CD4⁺T-Zellen die Abwesenheit von CD8⁺T-Zellen offenbar ausgleichen und einen ebenso guten Schutz vermitteln. Dies zeigt nicht nur die Resistenz der C57BL/6 MHCII^{-/-}-Mäuse gegenüber *R. typhi*, sondern auch der adoptive Transfer von CD4⁺T-Zellen in *R. typhi*-infizierte C57BL/6 RAG1^{-/-}- und CB17 SCID-Mäuse. Der Transfer immuner CD4⁺T-Zellen konnte C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse schützen und das Bakterienwachstum erfolgreich kontrollieren. Hier erfolgte der T-Zelltransfer zu einem Zeitpunkt, an dem sich die *R. typhi*-Infektion bereits etablieren konnte [114]. Im Gegensatz zu CD8⁺T-Zellen, die unabhängig vom Zeitpunkt des Transfers einen 100 %igen Schutz gewährleisteten, waren CD4⁺T-Zellen weniger effizient, wenn der Transfer zu einem späten Zeitpunkt, am 63. Tag nach Infektion, erfolgte. Während CD8⁺T-Zellen *R. typhi* 7 Tage nach dem Transfer bereits nahezu vollständig eliminiert hatten, war die Bakterienlast in CD4⁺T-Zellrezipienten lediglich tendenziell verringert. Dennoch konnte der Transfer von CD4⁺T-Zellen zu diesem späten Infektionszeitpunkt noch 60 % der C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse vor dem tödlichen Ausgang der Infektion bewahren.

Ebenso führte auch der Transfer naiver CD4⁺T-Zellen in *R. typhi*-infizierten CB17 SCID-Mäusen zu einer signifikant gesteigerten Überlebensrate und langfristigen Kontrolle des Bakterienwachstums. Im Gegensatz zu CB17 SCID-Mäusen, die CD8⁺T-Zellen erhalten hatten, verlief die *R. typhi*-Infektion nach Transfer von CD4⁺T-Zellen jedoch nicht asymptomatisch. Symptome sowie erhöhte Serum-GPT-Konzentrationen traten mit gleicher Kinetik wie bei infizierten Kontrollmäusen auf. Die Erkrankung war aber im Vergleich mild, und die Mäuse erholten sich bis zum 21. Tag nach Infektion wieder. Die Eliminierung der Bakterien durch CD4⁺T-Zellen war auch in diesem Infektionsmodell im Vergleich zu der durch CD8⁺T-Zellen

5 Diskussion

verzögert. Während CD8⁺T-Zellen die Bakterien bereits 7 Tage nach der Infektion weitgehend eliminiert hatten, war die Bakterienlast in den Organen der CD4⁺T-Zellrezipienten noch mit der von Kontrollmäusen vergleichbar. Entsprechend dem Transfer von CD8⁺T-Zellen, war der CD4⁺T-Zell-vermittelte Schutz nicht auf unspezifische Effekte, wie einer temporären Überexpression von Effektormolekülen infolge des Transfers, zurückzuführen. Die Infektion von CB17 SCID-Mäusen, die erst 14 Tage nach Erhalt der CD4⁺T-Zellen mit *R. typhi* infiziert wurden, nahm einen ähnlichen Verlauf wie die Infektion, die am Folgetag des T-Zelltransfers durchgeführt wurde. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass CD8⁺T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺T-Zellen imstande sind, die Infektion schneller zu kontrollieren. Allerdings können auch CD4⁺T-Zellen einen hinreichenden Schutz gegenüber der Infektion mit *R. typhi* vermitteln. Die schützende Wirkung eines CD4⁺ T-Zelltransfers wurde darüber hinaus auch in *R. conorii*-infizierten C3H/HeN-Mäusen gezeigt. Nach dem Transfer immuner CD4⁺T-Zellen überlebten diese Mäuse die Infektion mit einer normalerweise tödlichen Dosis *R. conorii* [163].

Um einen Eindruck über die Wirkungsweise der CD4⁺T-Zellen *in vivo* zu erhalten, wurde 7 Tage nach T-Zelltransfer die Zytokinkonzentration im Serum von *R. typhi*-infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen bestimmt. Im Vergleich zu Kontrollmäusen und CD8⁺ T-Zellrezipienten war die IFN γ -Konzentration im Serum von Mäusen, die CD4⁺T-Zellen erhalten hatten, erhöht. Dies belegt, dass aktivierte CD4⁺T-Zellen dieses Zytokin *in vivo* freisetzen. Darüber hinaus wurden immunhistochemische und durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurde insbesondere die Immunreaktion im Gehirn der Tiere analysiert, da dieses Organ in *R. typhi*-infizierten C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen die höchste Erregerlast aufweist [114]. Die Untersuchungen zeigten, dass CD4⁺T-Zellen, 7 Tage nach dem Transfer, im Gehirn aller Empfängermause nachweisbar waren. Zudem ließen sich die T-Zellen auch im Rückenmark der Mäuse detektieren. Die Anwesenheit der T-Zellen im ZNS war mit einem signifikanten Anstieg der Frequenz iNOS-exprimierender Makrophagen und Mikroglia verbunden. Hierbei spielt vermutlich das von CD4⁺T-Zellen freigesetzte IFN γ eine Rolle. Dieses Zytokin ist ein wichtiger Induktor für die Expression von iNOS [143, 144]. iNOS selbst katalysiert die Bildung von NO, das für die Beseitigung intrazellulärer Pathogene von großer Bedeutung ist [182]. Makrophagen sind neben Endothelzellen Zielzellen von *R. typhi* [32, 35]. Die Bakterien lassen sich auch in Makrophagen detektieren, die in das ZNS infizierter C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäuse migrieren [114]. Die Beobachtungen legen daher nahe, dass CD4⁺T-Zellen die Eliminierung von *R. typhi* fördern, indem sie die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen und Mikroglia steigern. Bei einigen C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen, die CD4⁺T-Zellen erhalten hatten, waren die Bakterien in der Tat bereits 7 Tage nach dem Transfer kaum noch nachweisbar. Im Gehirn dieser Mäuse ließ sich dennoch ein deutlich erhöhter Anteil iNOS-exprimierender Makrophagen und Mikroglia nachweisen. Eine erhöhte iNOS-Expression in Makrophagen und Mikroglia wird auch bei anderen Infektionen, die das ZNS betreffen, mit einer Reduzie-

rung der Erregerlast in Zusammenhang gebracht [199–201]. Die Freisetzung von NO durch iNOS ist im Gehirn mit neuropathologischen Effekten assoziiert. NO führt zur Schädigung bzw. zum Zelltod von Neuronen und Oligodendrozyten [202–204] und ist an der Pathologie verschiedener Erkrankungen, wie der Alzheimer, Parkinson, Multiples Sklerose und Schlaganfall beteiligt [205, 206]. Im Gehirn von C57BL/6 RAG1^{-/-}-Mäusen, die der Infektion mit *R. typhi* trotz CD4⁺T-Zelltransfers erlagen, waren keine Bakterien mehr nachweisbar. Die Entwicklung einer neurologischen Erkrankung ist in diesem Fall vermutlich auf immunpathologische Effekte und nicht auf die direkte Schädigung neuronaler Zellen durch die Bakterien zurückzuführen.

Im Zuge dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass CD4⁺T-Zellen genauso in der Lage sind, *R. typhi* zu eliminieren und infizierte Mäuse vor einem tödlichen Krankheitsverlauf zu schützen wie CD8⁺T-Zellen. Voraussetzung hierfür ist die rechtzeitige Anwesenheit dieser Zellen.

5.4 Funktionelle Voraussetzungen für den Schutz durch CD8⁺ und CD4⁺T-Zellen

In resistenten C57BL/6- und BALB/c-Mäusen kommt es im Verlauf der Infektion mit *R. typhi* zum Anstieg der Frequenz zytotoxischer CD8⁺T-Zellen, die Granzym B und IFN γ exprimieren sowie zur Ausbildung einer CD4⁺ T_H1-Zellantwort, die durch die Freisetzung von IFN γ und TNF α charakterisiert ist. In den vorangegangenen Kapiteln wurde beschrieben, dass sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺T-Zellen T- und B-Zell-defiziente Mäuse vor einem letalen Ausgang der *R. typhi*-Infektion schützen und die Bakterien erfolgreich eliminieren. Im letzten Teil der Arbeit wurden die für diesen Schutz zugrundeliegenden Mechanismen untersucht.

5.4.1 CD8⁺T-Zellen schützen unabhängig ihrer Perforin-vermittelten Zytotoxizität

CD8⁺T-Zellen sind imstande, infizierte Zellen gezielt abzutöten. Für die Abwehr der meisten intrazellulären Erreger sind CD8⁺T-Zellen daher von entscheidender Bedeutung. Der programmierte Zelltod kann in infizierten Zielzellen durch einen Granula- oder Rezeptor-vermittelten Signalweg eingeleitet werden [192]. Die Hauptfunktion der Rezeptor-vermittelten Apoptose ist die Beseitigung selbstreaktiver lymphoider Zellen [168]. Für die Eliminierung von intrazellulären Pathogenen ist dieser Signalweg von geringer Relevanz [207]. Die Induktion des programmierten Zelltods über den Granula-vermittelten Signalweg erfolgt durch die Freisetzung von Perforin und Granzymen [186]. In Abwesenheit von Perforin ist es CD8⁺T-Zellen nicht möglich, eine Granula-vermittelte Apoptose einzuleiten. Eine Perforindefizienz führt zu einer massiven Beeinträchtigung der Eliminierung von Viren und anderen intrazellulären Pathogenen [207, 208]. Auf die Überlebenswahrscheinlichkeit *R. typhi*-infizierter Mäuse

5 Diskussion

hatte die Abwesenheit von Perforin erstaunlicherweise keinen Einfluss. BALB/c Perforin^{-/-}-Mäuse wiesen zu keinem Zeitpunkt Symptome der Erkrankung auf und überlebten eine Infektion mehr als 120 Tage. Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass BALB/c Perforin^{-/-}-Mäuse über funktionelle CD4⁺T-Zellen verfügen, die einen adäquaten Schutz vermitteln können. Überraschenderweise führte aber auch der Transfer von Perforin-defizienten CD8⁺T-Zellen in *R. typhi*-infizierten CB17 SCID-Mäusen zu einem 100 %igen Schutz. Nach dem Transfer von CD8⁺T-Zellen aus BALB/c Perforin^{-/-}-Mäusen überlebten alle CB17 SCID-Mäuse ohne Anzeichen einer Erkrankung. Zudem eliminierten Perforin-defiziente CD8⁺T-Zellen *R. typhi* erfolgreich. Die Bakterienlast lag 128 Tage nach der Infektion in allen untersuchten Organen unterhalb der Nachweisgrenze. Dieses Ergebnis zeigt, dass CD8⁺T-Zellen ohne Perforin-vermittelte Zytotoxizität vor einer *R. typhi*-bedingten Erkrankung schützen.

In vorangegangene Studien wurde die Bedeutung von Perforin bisher lediglich für die Bekämpfung von *R. australis*, einem Vertreter der Übergangsgruppe, untersucht. Dabei war die tödliche Dosis von *R. australis* in C57BL/6 Perforin^{-/-}-Mäusen, verglichen mit der von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen, 100-mal geringer [165]. Bei der Abwehr dieser Rickettsien spielt Perforin offenbar eine wesentlich wichtigere Rolle als bei der Bekämpfung von *R. typhi*.

Neben zytotoxischen Effektorproteinen, wie Granzym B, exprimieren CD8⁺T-Zellen in der *R. typhi*-Infektion auch IFN γ . Dieses Zytokin kann einen wichtigen Beitrag zur Abwehr intrazellulärer Pathogene leisten. Zu einer der wichtigsten Aufgaben von IFN γ zählt die Aktivierung der antimikrobiellen Funktion von Makrophagen [185]. Der in Abwesenheit von Perforin gewährte Schutz durch CD8⁺T-Zellen beruht daher vermutlich auf der Freisetzung von IFN γ . Die Rolle von IFN γ bei der Abwehr von *R. typhi* wurde zunächst in BALB/c IFN γ ^{-/-}-Mäusen untersucht. In Studien mit C57BL/6 IFN γ ^{-/-}-Mäusen wurde gezeigt, dass das Fehlen von IFN γ zu einer deutlich erhöhten Suszeptibilität gegenüber *R. australis* führt. Die letale Dosis *R. australis* war hierbei um das 100fache gegenüber C57BL/6 Wildtyp-Mäusen verringert [165]. Das Fehlen von IFN γ hatte bei *R. typhi*-infizierten BALB/c IFN γ ^{-/-}-Mäusen jedoch keinen Einfluss auf die Überlebensrate. Eine Infektion verlief in diesen Mäusen völlig asymptomatisch. Die Abwehr von *R. typhi* beruht in BALB/c IFN γ ^{-/-}-Mäusen vermutlich auf der zytotoxischen Aktivität der CD8⁺T-Zellen und der Antwort der CD4⁺T-Zellen, die in Abwesenheit von IFN γ zu T_H17-Zellen differenzieren (Abschn. 5.4.2). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IFN γ -defiziente CD8⁺T-Zellen fähig sind, CB17 SCID-Mäuse vor dem Auftreten einer Erkrankung zu schützen. Durch den Transfer der CD8⁺T-Zellen aus BALB/c IFN γ ^{-/-}-Mäusen konnte in *R. typhi*-infizierten CB17 SCID-Mäusen ein 100 %iger Schutz erzielt werden. In dieser Situation kann die schützende Wirkung der CD8⁺T-Zellen nur auf die zytotoxische Aktivität der Zellen zurückgeführt werden. Interessant ist hierbei, dass sich in 80 % der Mäuse, die CD8⁺IFN γ ^{-/-}T-Zellen erhalten hatten, am Ende des Experiments (120 Tage nach Infektion) noch geringe Mengen *R. typhi*, vornehmlich im Gehirn, nachweisen ließen. Im Gegensatz

dazu waren bei der Mehrzahl der CD8⁺Perforin^{-/-}-T-Zellrezipienten zu diesem Infektionszeitpunkt keine Bakterien mehr detektierbar. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass *R. typhi* vorzugsweise im Gehirn, einem immunprivilegierten Organ, persistiert. Die Persistenz von *R. typhi* im Gehirn wurde bereits bei Ratten und Mäusen dokumentiert [209]. Die Bakterien ließen sich auch dort über Monate nachweisen, obwohl die Tiere keine Symptome aufwiesen. Im Gegensatz zur Infektion mit *R. typhi* ist die zytotoxische Aktivität der CD8⁺-T-Zellen bei der Abwehr von *R. australis* von größerer Relevanz als die Freisetzung von IFN γ . So sind C57BL/6 Perforin^{-/-}-Mäuse deutlich anfälliger für eine *R. australis*-Infektion als C57BL/6 IFN γ ^{-/-}-Mäuse [165]. Darüber hinaus führte ein Transfer immuner IFN γ -defizienter CD8⁺-T-Zellen bei *R. australis*-infizierten C57BL/6 IFN γ ^{-/-}-Mäusen zu einer deutlich reduzierten Erregerlast und einem verbesserten Schutz [165]. Für die Abwehr und Langzeitkontrolle von *R. typhi* scheint hingegen die Freisetzung von IFN γ wichtiger zu sein als die zytotoxische Aktivität der CD8⁺-T-Zellen.

5.4.2 Sowohl CD4⁺T_H1- als auch CD4⁺T_H17-Zellen wirken protektiv gegenüber *R. typhi*

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CD4⁺-T-Zellen T- und B-defiziente Mäuse vor einem tödlichen Verlauf einer *R. typhi*-Infektion schützen. Funktionell zeichnen sich diese Zellen in der *R. typhi*-Infektion von Wildtyp-Mäusen durch die Produktion von IFN γ und TNF α aus und weisen daher einen T_H1-Phänotyp auf. Diese Zytokine waren nicht nur nach Antigen-abhängiger *in-vitro*-Restimulation messbar, sondern ließen sich in erhöhter Konzentration auch im Serum von CB17 SCID-Mäusen nachweisen, die CD4⁺-T-Zellen erhalten hatten. IFN γ steigert die bakterizide Aktivität von Makrophagen und Endothelzellen, indem es die Expression von iNOS und folglich die Freisetzung von NO induziert [143–145]. TNF α ist ebenfalls in der Lage, Endothelzellen und Makrophagen zu aktivieren. Bei der Induktion von reaktiven Stickstoffmetaboliten in Makrophagen kann TNF α mit IFN γ kooperieren [210]. Die Bedeutung der von den CD4⁺-T-Zellen freigesetzten Zytokine für die Aktivierung *R. typhi*-infizierter Makrophagen und die Eliminierung der Bakterien wurde zunächst *in vitro* untersucht. Diese Studien zeigten, dass immune CD4⁺-T-Zellen, aus *R. typhi*-infizierten BALB/c-Mäusen, die Freisetzung von NO in infizierten Makrophagen induzieren und das Bakterienwachstum inhibieren. Da bei CD4⁺-T-Zellen keine zytotoxischen Eigenschaften nachweisbar waren, muss dieser Effekt auf die gesteigerte bakterizide Wirkung der Makrophagen in Anwesenheit von immunen CD4⁺-T-Zellen zurückzuführen sein. Die Neutralisation von IFN γ oder TNF α inhibierte die Sekretion von NO. Dies belegt, dass beide Zytokine an der Induktion der NO-Freisetzung beteiligt sind. Die Hemmung des Bakterienwachstums in Anwesenheit immuner CD4⁺-T-Zellen wurde jedoch durch Neutralisation von IFN γ und TNF α nicht vollständig aufgehoben. Eine Erklärung dafür könnte die unvollständige Neutralisation der Zytokine sein. Eindeutig belegt wurde die bakterizide Wirkung beider Zytokine durch die Behandlung infi-

5 Diskussion

zierter Makrophagen mit rekombinantem IFN γ und TNF α . Die Inkubation *R. typhi*-infizierter Makrophagen mit IFN γ oder TNF α reduzierte die Erregerlast deutlich, auch wenn keines der Zytokine zur Freisetzung messbarer NO-Mengen führte (Daten nicht gezeigt). Hierfür scheinen daher entweder weitere Faktoren notwendig, oder aber die eingesetzte Konzentration der Zytokine war nicht ausreichend, um die Freisetzung messbarer Mengen NO zu induzieren. Der Einfluss von IFN γ und TNF α auf das Bakterienwachstum *in vitro* wurde auch in Studien mit *R. prowazekii* und *R. conorii* untersucht. In *R. prowazekii*-infizierten L929-Fibroblasten wurde die NO-Produktion durch Zugabe von IFN γ und TNF α induziert und die Erregerlast reduziert [211]. Eine Hemmung der NO-Synthese durch N-Methyl-L-Arginin verringerte den bakteriziden Effekt von IFN γ und TNF α bei der Infektion von L929-Fibroblasten mit *R. prowazekii* 83-2P [211]. Bei der Infektion mit *R. prowazekii* Madrid E wurde die Wirkung von IFN γ und TNF α durch N-Methyl-L-Arginin hingegen nur leicht verändert [211]. Die antimikrobielle Wirkung von IFN γ und TNF α erfolgt hier sowohl über einen NO-abhängigen als auch unabhängigen Mechanismus. Ferner belegen Versuche mit *R. conorii*, dass rekombinantes TNF α das Bakterienwachstum in HEp2-Zellen hemmt. Der inhibitorische Effekt von TNF α wurde durch Zugabe von rekombinantem IFN γ zusätzlich gesteigert [212]. Die Bedeutung von IFN γ und TNF α bei der Abwehr von Rickettsien bestätigten auch verschiedene *in-vivo*-Untersuchungen. Die Depletion von IFN γ oder TNF α war bei *R. conorii*-infizierten C3H/HeN-Mäusen mit einem unkontrollierten Bakterienwachstum verbunden und führte zum Tod aller Mäuse bei einer normalerweise subletalen Dosis [142]. Swiss-Webster-Mäuse, die resistent gegenüber der *R. conorii*-Infektion sind, entwickelten nach der Neutralisierung von IFN γ Symptome und etwa die Hälfte der Mäuse verstarb infolge der Infektion [164]. Bei C3H/HeN-Mäusen nahm die Erregerlast und Sterblichkeit, bei einer gewöhnlich subletalen Dosis *R. typhi*, durch die Neutralisierung von IFN γ deutlich zu [106]. In Verbindung mit der Literatur legen die Ergebnisse der Arbeit nahe, dass CD4⁺T-Zellen in der *R. typhi*-Infektion zu T_H1-Zellen differenzieren und Schutz durch die Freisetzung von IFN γ und TNF α vermitteln. Dennoch ist die Rolle von IFN γ bei der Abwehr von *R. typhi* nicht eindeutig geklärt. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, hatte das Fehlen von IFN γ bei *R. typhi*-infizierten BALB/c-Mäusen im Gegensatz zu C3H/HeN-Mäusen keine Auswirkungen. BALB/c IFN γ ^{-/-}-Mäuse entwickelten keine Symptome und überlebten die Infektion. Im Vergleich zu BALB/c- und C57BL/6-Mäusen, sind C3H/HeN-Mäuse jedoch grundsätzlich empfänglicher für Rickettsieninfektionen, sodass auch stammspezifische Unterschiede in der Immunantwort einen Einfluss auf das Ergebnis haben können [103]. Durch den adoptiven Transfer von IFN γ -defizienten CD4⁺T-Zellen in *R. typhi*-infizierte CB17 SCID-Mäuse konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass CD4⁺T-Zellen in der Lage sind, ohne IFN γ Schutz zu vermitteln. 30 - 90 % dieser Mäuse überlebten die Infektion mit *R. typhi*. Darüber hinaus führte der Transfer von CD4⁺ IFN γ ^{-/-}-T-Zellen in CB17 SCID-Mäusen zur deutlichen Abnahme der Erregerlast und Langzeitkontrolle des Bakterienwachstums. Mehr als 120 Tage nach *R. typhi*-Infektion lie-

5 Diskussion

ßen sich die Bakterien nur noch in wenigen Empfängerermäusen in geringer Zahl nachweisen. Diese Tiere zeigten dennoch keine Symptome. Selbst in Mäusen, die der Infektion trotz T-Zelltransfers erlagen, wurde eine reduzierte Erregerlast im Vergleich zur infizierten Kontrollgruppe detektiert.

Zunächst wurde vermutet, dass $\text{TNF}\alpha$ in diesem Szenario das Fehlen von $\text{IFN}\gamma$ kompensiert und für den Schutz durch $\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -T-Zellen verantwortlich ist. Diese Annahme ließ sich jedoch nicht bestätigen. Entgegen den Erwartungen führte die Neutralisation von $\text{TNF}\alpha$ nach Transfer von $\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -T-Zellen sogar zu einem mildereren Krankheitsverlauf und steigerte die Überlebenswahrscheinlichkeit. Zudem reduzierten die transferierten $\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -T-Zellen die Erregerlast unabhängig von $\text{TNF}\alpha$. $\text{TNF}\alpha$ ist daher nicht nur für die Erregerabwehr entbehrlich, sondern besitzt offenbar pathologische Effekte, die nach einem Transfer von CD4^+ -T-Zellen aus BALB/c Wildtyp-Mäusen nicht sichtbar waren. Die schützende Wirkung von $\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -T-Zellen musste demnach auf anderen Faktoren beruhen. Anschließende Analysen zeigten, dass $\text{IFN}\gamma$ -defiziente CD4^+ -T-Zellen im Verlauf einer *R. typhi*-Infektion zu $\text{T}_\text{H}17$ -Zellen differenzieren. Im Gegensatz zu immunen CD4^+ -T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen setzten $\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -T-Zellen nach Antigenerkennung *in vitro* neben vergleichbaren Mengen $\text{TNF}\alpha$ vor allem die $\text{T}_\text{H}17$ -Zytokine IL-17 und IL-22 frei. Offenbar vermitteln auch diese Zellen einen Schutz gegenüber *R. typhi*. IL-17A induziert in Makrophagen und Gewebezellen die Bildung proinflammatorischer Zytokine (IL-6, $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β) [213] und Chemokine (CXCL1, CXCL6, CXCL8, CINC, CCL2) [214]. Durch die Freisetzung der Chemokine werden Neutrophile zum Infektionsherd gelockt, wo diese zur Erregereliminierung beitragen können [155, 156]. IL-17A steigert darüber hinaus die Produktion von NO [157] und Matrixmetalloproteinasen [215]. Zusammen mit IL-22 erhöht IL-17A die Expression antimikrobieller Peptide in Epithelzellen [158, 160]. All diese Mechanismen können zur Abwehr von *R. typhi* beitragen. *In vitro* reduzierten immunere $\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -T-Zellen ebenso wie CD4^+ -T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen das Bakterienwachstum in Makrophagen. Dies zeigt, dass die von $\text{T}_\text{H}17$ -Zellen sekretierten Zytokine einen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität *R. typhi*-infizierter Makrophagen ausüben.

Eine schützende Funktion von $\text{T}_\text{H}17$ -Zellen ist bisher vor allem für die Abwehr extrazellulärer Erreger bekannt [155, 216, 217]. In einigen jüngeren Publikationen konnte jedoch gezeigt werden, dass $\text{T}_\text{H}17$ -Zellen auch gegenüber intrazellulären Erregern Schutz vermitteln können [218–220]. So inhibiert IL-17A das Wachstum von *C. muridarum* in der Lunge infizierter Mäuse *in vivo* sowie in Lungenepithelzellen und Makrophagen *in vitro* [221]. Die protektive Wirkung von IL-17A erfolgt hier über die Steigerung der $\text{IFN}\gamma$ -induzierten iNOS-Expression und NO-Freisetzung [221]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen führte IL-17A *in vitro* ebenfalls zu einer erhöhten NO-Synthese in Makrophagen, die mit *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infiziert waren [222]. Darüber hinaus war der Transfer immuner $\text{T}_\text{H}17$ $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Zellen in *Mycobacterium tuberculosis*-infizierten C57BL/6 $\text{RAG1}^{-/-}$ -

5 Diskussion

Mäusen mit einer reduzierten Bakterienlast und einer gesteigerten Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden [223]. IL-17A ist auch bei der Abwehr einzelliger intrazellulärer Parasiten relevant. Das Fehlen von IL-17 resultiert bei *Trypanosoma (T.) cruzi*-infizierten C57BL/6 IL-17^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp-Mäusen in einer erhöhten Erregerlast und einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit [224]. *In vitro* induzieren T_H17-Zellen in *T. cruzi*-infizierten Makrophagen, in Abhängigkeit von IL-17A, die Expression der NADPH-Oxidase und reduzieren dadurch die Erregerlast [225]. Die NADPH-Oxidase ist an der Bildung toxischer Sauerstoffderivate beteiligt - Moleküle, die für die Beseitigung von Pathogenen in Makrophagen und Neutrophilen bedeutsam sind [225]. Des Weiteren wurde in Studien mit dem intrazellulären Parasiten *Eimeria (E.) falciformis* gezeigt, dass die Behandlung infizierter Epithelzellen mit IFN γ , IL-22 oder IL-17A *in vitro* zu einem reduzierten Parasitenwachstum führt [226]. Ähnlich CD4⁺T-Zellen aus *R. typhi*-infizierten BALB/c IFN γ ^{-/-}-Mäusen produzierten auch CD4⁺T-Zellen aus *E. falciformis*-infizierten C57BL/6 IFN γ ^{-/-}-Mäusen vermehrt IL-17A und IL-22 [226]. Sowohl C57BL/6 IFN γ R^{-/-} - als auch IFN γ ^{-/-}-Mäuse wiesen nach der *E. falciformis*-Infektion im Vergleich zu C57BL/6 Wildtyp-Mäusen eine reduzierte Parasitenlast auf [226]. Demzufolge ist IFN γ auch für die Eliminierung dieses Parasiten entbehrlich. In dieser Studie wurde zudem festgestellt, dass die Neutralisation von IL-22 und IL-17A in Kombination oder IL-22 allein eine erhöhte Parasitenlast in C57BL/6 IFN γ ^{-/-}-Mäusen zur Folge hat [226]. Dies deutet auf einen dominanten Effekt von IL-22 bei der Abwehr von *E. falciformis* hin.

Aufgrund dieser Beschreibungen lag es nahe, auch die Rolle von IL-17A in der Infektion mit *R. typhi* zu untersuchen. Entgegen den Erwartungen wurde die schützende Funktion von CD4⁺IFN γ ^{-/-}T_H17-Zellen in *R. typhi*-infizierten CB17 SCID-Mäusen durch die Neutralisation von IL-17A nicht herabgesetzt. Im Gegenteil - die Inhibierung von IL-17 führte in Empfängermäusen, ähnlich wie die Neutralisation von TNF α , zu einem geringeren Gewichtsverlust und einem mildereren Krankheitsverlauf. Die Mäuse waren zudem in der Lage, *R. typhi* effizient zu eliminieren. Selbst in Tieren, die der Infektion trotz des T-Zelltransfers erlagen, waren die Bakterien kaum noch nachweisbar. Zusammengefasst zeigen diese Beobachtungen, dass T_H17-Zellen in Abwesenheit von TNF α oder IL-17A einen guten Schutz vermitteln, während die Kombination beider Zytokine offenbar pathologische Effekte besitzt. Welche Rolle IL-22 bei der Abwehr von *R. typhi* spielt, ist noch unklar. Dieses Zytokin wirkt nicht auf Immunzellen, könnte aber zur Beseitigung der Bakterien durch die Induktion antimikrobieller Peptide in infizierten Nicht-Immunzellen wie Fibroblasten und Endothelzellen beitragen [158, 160]. Die pathologische Wirkung von TNF α und IL-17 ist durchaus bekannt und wird z. B. mit Entzündungen der Atemwege in Zusammenhang gebracht [227]. Darüber hinaus wurden pathologische Effekte von TNF α und IL-17 ebenfalls bei der Infektion mit *E. falciformis* beobachten [226]. Eine *E. falciformis*-Infektion war in C57BL/6 IFN γ ^{-/-}-Mäusen, deren CD4⁺T-Zellen ebenfalls vermehrt IL-17 und IL-22 produzieren, mit einem erhöhten Gewichtsverlust und

5 Diskussion

einer verstärkter Darmpathologie verbunden, obwohl die Mäuse die Parasitenlast reduzieren konnten [226]. Wie bereits erwähnt, induziert IL-17A die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6, TNF α und IL-1 β [214, 228–231]. Zudem kann IL-17A mit diesen Mediatoren in synergistischer Weise Entzündungsreaktionen fördern und zu Gewebeschädigung führen [232, 233]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf synergistische pathologische Effekte von TNF α und IL-17A in der *R. typhi*-Infektion hin. Ein weiteres Indiz für die pathologische Wirkung von T_H17-Zytokinen ist die Beobachtung, dass *E. falciformis*-infizierte C57BL/6 IFN γ ^{-/-}-Mäuse eine verstärkte Pathologie und einen erhöhten Gewichtsverlust aufweisen, obwohl die Parasitenlast gegenüber Wildtyp-Mäusen reduziert war [226].

Ob T_H17-Zellen *R. typhi* genauso effizient eliminieren wie T_H1-Zellen, bleibt unklar. Im Vergleich zu CB17 SCID-Mäusen, die CD4⁺T-Zellen aus BALB/c Wildtyp-Mäusen erhalten hatten, waren die Symptome der *R. typhi*-infizierten Tiere nach einem Transfer von CD4⁺ IFN γ ^{-/-}-T-Zellen über einen längeren Zeitraum sichtbar. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass T_H1-Zellen die Bakterien schneller beseitigen. Abgesehen davon, ließ sich *R. typhi* mehr als 160 Tage nach der Infektion auch in Mäusen, die CD4⁺T-Zellen aus BALB/c IFN γ ^{-/-}-Mäusen erhalten hatten, nicht mehr nachweisen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass sowohl T_H1- als auch T_H17-Zellen in der Lage sind, Schutz gegenüber der Infektion mit *R. typhi* zu vermitteln. T_H17-Zellen sind hierbei voraussichtlich ebenso effizient wie T_H1-Zellen, sofern die immunpathologischen Effekte von TNF α oder IL-17A minimiert werden. Der Schutz wird vermutlich in erster Linie durch die Steigerung der bakteriziden Aktivität von Makrophagen vermittelt.

5 Diskussion

Abschließend gibt Abbildung 5.1 einen Überblick über die hypothetische Wirkweise der verschiedenen T-Zellpopulationen in der Infektion mit *R. typhi*.

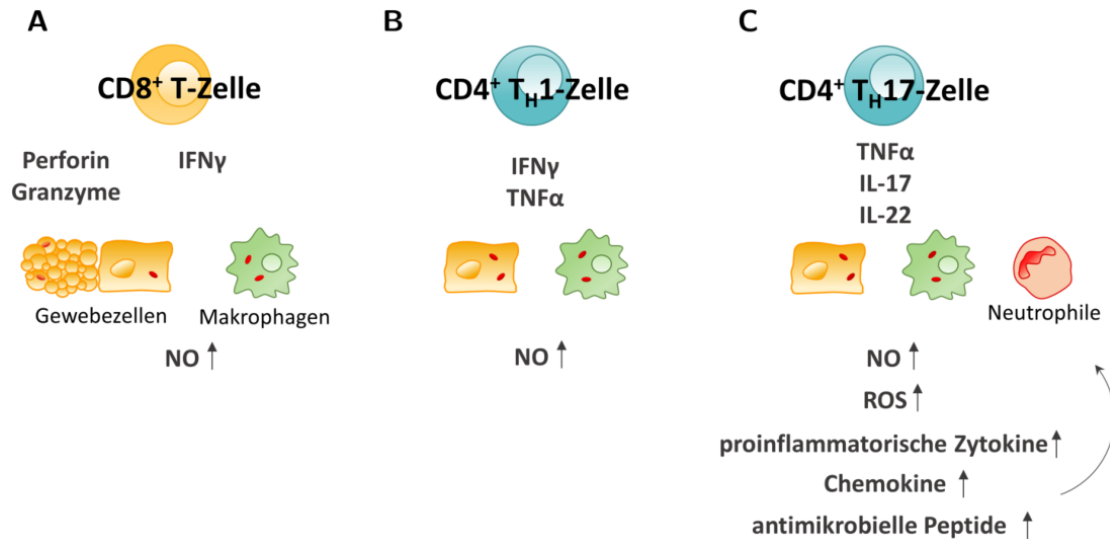


Abbildung 5.1: Hypothetische Wirkmechanismen von CD8⁺ und CD4⁺T-Zellen in der *R. typhi*-Infektion.

Durch die Freisetzung von Perforin und Granzymen sind CD8⁺T-Zellen in der Lage, in infizierten Zielzellen den programmierten Zelltod auszulösen. Darüber hinaus sekretieren CD8⁺T-Zellen IFN γ , das in Makrophagen und anderen Zellen die Synthese von antimikrobiellem NO induziert. Beide Mechanismen vermitteln unabhängig voneinander einen ausreichenden Schutz gegenüber der *R. typhi*-Infektion (A). CD4⁺T-Zellen differenzieren in der *R. typhi*-Infektion normalerweise zu T_H1-Zellen, die verstärkt IFN γ sowie TNF α freisetzen. Beide Zytokine induzieren in Makrophagen, aber auch anderen Zellen, die Freisetzung von bakterizidem NO. T_H1-Zellen vermitteln auf diese Weise einen effektiven und langfristigen Schutz gegenüber *R. typhi* (B). In Abwesenheit von IFN γ differenzieren CD4⁺T-Zellen in der *R. typhi*-Infektion zu T_H17-Zellen, die neben TNF α große Mengen IL-17A und IL-22 sekretieren. IL-17A und TNF α induzieren in Makrophagen und Gewebezellen die Synthese von NO und ROS. Darüber hinaus fördern IL-17A und TNF α die Bildung proinflammatorischer Zytokine. IL-17A steigert zudem die Freisetzung von Chemokinen, die zur Rekrutierung von Neutrophilen führen. IL-22 induziert in Gewebezellen u. a. die Synthese antimikrobieller Peptide. T_H17-Zellen vermitteln durch diese Mechanismen ebenfalls Schutz gegenüber *R. typhi*. Allerdings zeigen TNF α und IL-17A in synergistischer Weise pathologische Effekte. Diese beruhen vermutlich auf der gesteigerten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und der Aktivierung von Neutrophilen (C).

5.5 Ausblick

Das Verständnis der Immunmechanismen, die zur Abwehr von *R. typhi* beitragen, ist für die Entwicklung eines Impfstoffs von grundlegender Bedeutung. Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass CD4⁺T-Zellen, ebenso wie CD8⁺T-Zellen, Schutz gegenüber *R. typhi* vermitteln. In *R. typhi*-infizierten Wildtyp-Mäusen setzen CD4⁺T-Zellen vermehrt IFN γ frei und weisen damit einen T_H1-Phänotyp auf. In Abwesenheit von IFN γ differenzieren CD4⁺T-Zellen zu T_H17-Zellen, die IL-17A, IL-22 und TNF α sekretieren. Interessant ist, dass auch diese Zellen imstande sind, Schutz zu vermitteln. Die Neutralisierung von TNF α oder IL-17A führt hierbei nicht etwa zu einem verminderten Schutz, sondern zu einem milderen Krankheitsverlauf. Die gleichzeitige Freisetzung von TNF α und IL-17A durch CD4⁺T-Zellen hat daher offenbar pathologische Auswirkungen. Welche Rolle IL-22 in diesem Szenario spielt, ist bislang noch nicht geklärt. Es wäre daher wichtig, in weiteren Experimenten die Folgen einer kombinierten Neutralisation von IL-22 und TNF α , IL-22 und IL-17A sowie TNF α und IL-17A nach adoptivem Transfer von CD4⁺IFN γ ^{-/-}T-Zellen in CB17 SCID-Mäusen zu analysieren. Diese Untersuchungen würden Aufschluss über den Beitrag der einzelnen Zytokine zum Schutz und/oder zur Pathologie geben.

Generell ist die Erkenntnis der protektiven Wirkung von CD4⁺T-Zellen in der *R. typhi*-Infektion für die Impfstoffentwicklung von großer Relevanz. Die Induktion einer *R. typhi*-spezifischen CD4⁺T-Zellantwort ist vermutlich ausreichend, um einen adäquaten Schutz zu vermitteln. Dies ist von Vorteil, da die gezielte Induktion einer CD4⁺T-Zellantwort einfacher zu erzielen ist als die einer CD8⁺T-Zellantwort. In künftigen Arbeiten sollten immundominante *R. typhi*-Antigene identifiziert werden, die eine schützende CD4⁺T-Zellantwort auslösen können. Für die Identifizierung geeigneter Antigene könnten MHCII / Peptid-Komplexe von der Oberfläche *R. typhi*-infizierter APZ präzipitiert werden. Eine massenspektroskopische Analyse kann nachfolgend Aufschluss über die gebundenen Peptidfragmente geben. Die identifizierten Proteine müssten daraufhin synthetisiert und gereinigt werden. Abschließend müsste dann geprüft werden, ob die Proteine nach intrazellulärer Prozessierung von immunen CD4⁺T-Zellen aus *R. typhi*-infizierten Mäusen erkannt werden. Ein anderer Ansatz wäre die Erstellung einer bakteriellen Expressionsbank des *R. typhi*-Proteoms. Mit diesen Bakterienklonen können APZ gepulst und danach geprüft werden, ob die präsentierten Antigene von immunen CD4⁺T-Zellen erkannt werden. Die anschließende Sequenzierung der verwendeten Vektoren kann dann zur Identifizierung der Antigene führen.

Ebenfalls interessant ist die Beobachtung, dass bereits der Transfer weniger CD4⁺T-Zellen ausreichend ist, um *R. typhi*-infizierte CB17 SCID-Mäuse zu schützen. Möglicherweise gibt es nur eine geringe Anzahl immundominanter Antigene, die zur klonalen Expansion weniger T-Zellen führen. Es wäre daher auch sinnvoll, das TZR-Repertoire aktivierter CD4⁺T-Zellen in der *R. typhi*-Infektion zu bestimmen und CD4⁺T-Zellklone aus *R. typhi*-infizierten Wildtyp-Mäusen zu generieren. Diese Analysen können Hinweise darauf geben, wie viele T-Zellklone

5 Diskussion

sich in der Infektion durchsetzen. In Verbindung mit den oben genannten Experimenten könnte aufgeschlüsselt werden, welche Antigene diese Zellen erkennen.

Nach der Identifizierung von immundominanten CD4⁺T-Zellantigenen müsste deren Wirksamkeit in Immunisierungsexperimenten überprüft werden. Ein adoptiver Transfer von CD4⁺T-Zellen aus vakzinierten BALB/c-Mäusen in CB17 SCID-Mäuse, mit einer bereits etablierten Infektion, kann dann zeigen, inwiefern diese Zellen in der Lage sind, Schutz zu generieren. Hierbei sollte ebenfalls die Auswirkung der Immunisierung auf die Persistenz von *R. typhi* in Wildtyp-Mäusen analysiert werden. Schließlich wäre es wichtig zu prüfen, ob humane CD4⁺T-Zellen aus *R. typhi*-infizierten Personen die identifizierten Antigene erkennen. Dies wäre ein guter Hinweis darauf, dass eine Vakzinierung mit diesen Antigenen auch beim Menschen wirksam sein könnte.

Literaturverzeichnis

- [1] Abdu F Azad and Charles B Beard. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging infectious diseases*, 4(2):179, 1998.
- [2] Howard Taylor Ricketts. A micro-organism which apparently has a specific relationship to rocky mountain spotted fever: a preliminary report. *Journal of the American Medical Association*, 52(5):379–380, 1909.
- [3] P Fournier, Didier Raoult, D Raoult, and P Parola. Bacteriology, taxonomy, and phylogeny of rickettsia. *Infectious disease and therapy series*, 43:1, 2007.
- [4] Vicky Merhej, Emmanouil Angelakis, Cristina Socolovschi, and Didier Raoult. Genotyping, evolution and epidemiological findings of rickettsia species. *Infection, Genetics and Evolution*, 25:122–137, 2014.
- [5] Joseph J Gillespie, Kelly Williams, Maulik Shukla, Eric E Snyder, Eric K Nordberg, Shane M Ceraul, Chitti Dharmanolla, Daphne Rainey, Jeetendra Soneja, Joshua M Shallom, et al. Rickettsia phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life. *PloS one*, 3(4):e2018, 2008.
- [6] RN Philip, EA Casper, RL Anacker, J Cory, SF Hayes, W Burgdorfer, and CE Yunker. Rickettsia bellii sp. nov.: a tick-borne rickettsia, widely distributed in the united states, that is distinct from the spotted fever and typhus biogroups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(1):94–106, 1983.
- [7] Diane R Stothard, Jonathan B Clark, and Paul A Fuerst. Ancestral divergence of rickettsia bellii from the spotted fever and typhus groups of rickettsia and antiquity of the genus rickettsia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4):798–804, 1994.
- [8] Diane R Stothard and Paul A Fuerst. Evolutionary analysis of the spotted fever and typhus groups of rickettsia using 16s rna gene sequences. *Systematic and applied microbiology*, 18(1):52–61, 1995.
- [9] Akira Tamura, Norio Ohashi, Hiroshi Urakami, and Sadao Miyamura. Classification of rickettsia tsutsugamushi in a new genus, orientia gen. nov., as orientia tsutsuga-

- mushi comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(3):589–591, 1995.
- [10] Oleg Mediannikov, Thi-Thien Nguyen, Lesley Bell-Sakyi, Roshan Padmanabhan, Pierre-Edouard Fournier, and Didier Raoult. High quality draft genome sequence and description of *occidentia massiliensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family rickettsiaceae. *Standards in genomic sciences*, 9(1):9, 2014.
 - [11] Gerhard Dobler and Roman Wölfel. Fleckfieber und andere rickettsiosen. *Deutsches Ärzteblatt*, pages 348–354, 2009.
 - [12] GU Munderloh and JT Kurtti. Critical needs and gaps in understanding prevention, amelioration, and resolution of lyme and other tickborne diseases: The short-term and long-term outcomes. In *Institute of Medicine Committee on Lyme Disease and Other Tick-borne Diseases. Washington, DC: The State of the Science Workshop*, pages 15–176, 2010.
 - [13] S Ito, JW Vinson, and TJ McGuire. Murine typhus rickettsiae in the oriental rat flea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 266(1):35–60, 1975.
 - [14] A Farhang-Azad, R Traub, and CL Wisseman Jr. Rickettsia mooseri infection in the fleas leptoptylla segnis and xenopsylla cheopis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 32(6):1392–1400, 1983.
 - [15] Seymour G Williams, JB Sacci, ME Schriefer, EM Andersen, KK Fujioka, FJ Sorvillo, AR Barr, and AF Azad. Typhus and typhuslike rickettsiae associated with opossums and their fleas in los angeles county, california. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(7):1758–1762, 1992.
 - [16] Frank J Sorvillo, Barbara Gondo, Richard Emmons, Patrick Ryan, Stephen H Waterman, Arthur Tilzer, Ellen M Andersen, Robert A Murray, and R Barr. A suburban focus of endemic typhus in los angeles county: association with seropositive domestic cats and opossums. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 48(2):269–273, 1993.
 - [17] Ardys Boostrom, Magda S Beier, Jacqueline A Macaluso, Kevin R Macaluso, Daniel Sprenger, Jack Hayes, Suzana Radulovic, and Abdu F Azad. Geographic association of rickettsia felis-infected opossums with human murine typhus, texas. *Emerging infectious diseases*, 8(6):549–554, 2002.
 - [18] Lucas S Blanton, Boluwatife M Idowu, Tyler N Tatsch, Joshua M Henderson, Donald H Bouyer, and David H Walker. Opossums and cat fleas: new insights in the ecology of murine typhus in galveston, texas. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 95(2):457–461, 2016.

Literaturverzeichnis

- [19] Harvey B Morlan, Elmer L Hill, and Joseph H Schubert. Serological survey for murine typhus infection in southwest georgia animals. *Public Health Reports*, pages 57–63, 1950.
- [20] María-Mercedes Nogueras, Immaculada Pons, Júlia Pla, Anna Ortuño, Jaime Miret, Isabel Sanfeliu, and Ferran Segura. The role of dogs in the eco-epidemiology of rickettsia typhi, etiologi cal agent of murine typhus. *Veterinary microbiology*, 163(1):97–102, 2013.
- [21] Didier Raoult and Veronique Roux. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4):694–719, 1997.
- [22] Lucas S Blanton, Rahat F Vohra, Donald H Bouyer, and David H Walker. Reemergence of murine typhus in galveston, texas, usa, 2013. *Emerging infectious diseases*, 21(3):484, 2015.
- [23] Christos Christou, Anna Psaroulaki, Maria Antoniou, Pavlos Toumazos, Ioannis Ioannou, Apostolos Mazeris, Dimosthenis Chochlakis, and Yannis Tselentis. Rickettsia typhi and rickettsia felis in xenopsylla cheopis and lepto psylla segnis parasitizing rats in cyprus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 83(6):1301–1304, 2010.
- [24] R Traub and CL Wisseman. The ecology of murine typhus-a critical review. *Tropical diseases bulletin*, 75(4):237, 1978.
- [25] AF Azad. Relationship of vector biology and epidemiology of louse-and flea-borne rickettsioses. *Biology of rickettsial diseases*, 1:51–62, 1988.
- [26] A Farhang-Azad, R Traub, and S Baqar. Transovarial transmission of murine typhus rickettsiae in xenopsylla cheopis fleas. *Science*, 227:543–546, 1985.
- [27] Abdu F Azad, Suzana Radulovic, James A Higgins, BH Noden, and Jill M Troyer. Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. *Emerging infectious diseases*, 3(3):319, 1997.
- [28] AF Azad. Epidemiology of murine typhus. *Annual review of entomology*, 35(1):553–570, 1990.
- [29] Kristen E Rennoll-Bankert, M Sayeedur Rahman, Joseph J Gillespie, Mark L Guillotte, Simran J Kaur, Stephanie S Lehman, Magda Beier-Sexton, and Abdu F Azad. Which way in? the ralf arf-gef orchestrates rickettsia host cell invasion. *PLoS Pathog*, 11(8):e1005115, 2015.
- [30] Kristen E Rennoll-Bankert, M Sayeedur Rahman, Mark L Guillotte, Stephanie S Lehman, Magda Beier-Sexton, Joseph J Gillespie, and Abdu F Azad. Ralf-mediated activation of arf6 controls rickettsia typhi invasion by co-opting phosphoinositol metabolism. *Infection and Immunity*, 84(12):3496–3506, 2016.

Literaturverzeichnis

- [31] David H Walker, Nahed Ismail, Juan P Olano, Gustavo Valbuena, and Jere McBride. Pathogenesis, immunity, pathology, and pathophysiology in rickettsial diseases. *Infectious disease and therapy series*, 43:15, 2007.
- [32] L Beaman and CL Wisseman. Mechanisms of immunity in typhus infections. v. demonstration of rickettsia mooseri-specific antibodies in convalescent mouse and human serum cytophilic for mouse peritoneal macrophages. *Infection and immunity*, 14(4):1065–1070, 1976.
- [33] David H Walker, S David Hudnall, Wojciech K Szaniawski, and Hui-Min Feng. Monoclonal antibody-based immunohistochemical diagnosis of rickettsialpox: the macrophage is the principal target. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 12(5):529–533, 1999.
- [34] David H Walker, Hui-Min Feng, Stephen Ladner, Adrian N Billings, Sherif R Zaki, Douglas J Wear, and Barbara Hightower. Immunohistochemical diagnosis of typhus rickettsioses using an anti-lipopolysaccharide monoclonal antibody. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 10(10):1038–1042, 1997.
- [35] S Radulovic, PW Price, MS Beier, J Gaywee, JA Macaluso, and A Azad. Rickettsia-macrophage interactions: host cell responses to rickettsia akari and rickettsia typhi. *Infection and immunity*, 70(5):2576–2582, 2002.
- [36] Didier Raoult and Philippe Parola. *Rickettsial diseases*. CRC Press, 2007.
- [37] Martin E Schriefer, JB Sacci, J Stephen Dumler, Michael G Bullen, and Abdu F Azad. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4):949–954, 1994.
- [38] Kristina M McElroy, Byron L Blagburn, Edward B Breitschwerdt, Paul S Mead, and Jennifer H McQuiston. Flea-associated zoonotic diseases of cats in the usa: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. *Trends in parasitology*, 26(4):197–204, 2010.
- [39] Rachel Civen and Van Ngo. Murine typhus: an unrecognized suburban vectorborne disease. *Clinical Infectious Diseases*, 46(6):913–918, 2008.
- [40] Sarah F Whiteford, Jeffery P Taylor, and J Stephen Dumler. Clinical, laboratory, and epidemiologic features of murine typhus in 97 texas children. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 155(3):396–400, 2001.
- [41] Jeffery P Taylor, Thomas G Betz, and Julia A Rawlings. Epidemiology of murine typhus in texas: 1980 through 1984. *Jama*, 255(16):2173–2176, 1986.

- [42] Constantinos Tsioutis, George Chaliotis, Sofia Kokkini, Stephanos Doukakis, Yannis Tselentis, Anna Psaroulaki, and Achilleas Gikas. Murine typhus in elderly patients: a prospective study of 49 patients. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 46(11):779–782, 2014.
- [43] P Phatharodom, S Limsrichamrern, J Kaewwinud, and M Chayakulkeeree. Murine typhus in a liver transplant recipient: report of a first case. *Transplant Infectious Disease*, 17(4):574–578, 2015.
- [44] Naoya Sakamoto, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Ken-ichiro Kobayashi, Tomohiko Takasaki, Yumiko Ogasawara, Shuji Ando, Sentaro Iwabuchi, and Kenji Ohnishi. Severe murine typhus with shock and acute respiratory failure in a japanese traveler after returning from thailand. *Journal of travel medicine*, 20(1):50–53, 2013.
- [45] Thomas W van der Vaart, Pieter Pam van Thiel, Nicole P Juffermans, Michèle van Vugt, Suzanne E Geerlings, Martin P Grobusch, and Abraham Goorhuis. Severe murine typhus with pulmonary system involvement. *Emerging infectious diseases*, 20(8):1375, 2014.
- [46] Alexander J Stockdale, Michael P Weekes, Bridget Kiely, and Andrew ML Lever. Severe typhus group rickettsiosis complicated by pulmonary edema in a returning traveler from indonesia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(6):1121–1123, 2011.
- [47] Jaime Fergie and Kevin Purcell. Spontaneous splenic rupture in a child with murine typhus. *The Pediatric infectious disease journal*, 23(12):1171–1172, 2004.
- [48] SD McKelvey, PC Braidley, GP Stansby, and WRC Weir. Spontaneous splenic rupture associated with murine typhus. *Journal of Infection*, 22(3):296–297, 1991.
- [49] Ilan Ben-Zvi, Eyal Meltzer, Olga Feld, and Ilan Bank. A case of murine typhus associated with large vessel infarct of the spleen. *American Journal of the Medical Sciences*, 335(6):502–503, 2008.
- [50] N Amarapurkar Deepak and Nikhil D Patel. Differential diagnosis of acute liver failure in india. *Annals of hepatology*, 5(3):150–156, 2006.
- [51] Sally Roberts, P Hill, M Croxson, P Austin, J McKay, and Rod Ellis-Pegler. The evidence for rickettsial disease arising in new zealand. *The New Zealand medical journal*, 114(1138):372–374, 2001.
- [52] Y Shaked, O Shpilberg, and Y Samra. Involvement of the kidneys in mediterranean spotted fever and murine typhus. *QJM*, 87(2):103–107, 1994.

Literaturverzeichnis

- [53] AE Buchs, R Zimlichman, E Sikuler, and B Goldfarb. Murine typhus endocarditis. *Southern medical journal*, 85(7):751–753, 1992.
- [54] Silvana B Carr, Dale F Bergamo, Patricia J Emmanuel, and Jose A Ferreira. Murine typhus as a cause of cognitive impairment: case report and a review of the literature. *Pediatric neurology*, 50(3):265–268, 2014.
- [55] Neil G Simon, Phillip D Cremer, and Stephen R Graves. Murine typhus returns to new south wales: a case of isolated meningoencephalitis with raised intracranial pressure. *Med J Aust*, 194(12):652–654, 2011.
- [56] Tatiana Vander, Mordechay Medvedovsky, Svetlana Valdman, and Yuval Herishanu. Facial paralysis and meningitis caused by rickettsia typhi infection. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 35(11-12):887–888, 2003.
- [57] Dimitris Tsiachris, Melanie Deutsch, Dimitris Vassilopoulos, Rodessa Zafropoulou, and Athanasios J Archimandritis. Sensorineural hearing loss complicating severe rickettsial diseases: report of two cases. *Journal of Infection*, 56(1):74–76, 2008.
- [58] Shang-Yi Lin, Ya-Ling Wang, Hsiu-Fen Lin, Tun-Chieh Chen, Yen-Hsu Chen, and Po-Liang Lu. Reversible hearing impairment: delayed complication of murine typhus or adverse reaction to azithromycin? *Journal of medical microbiology*, 59(5):602–606, 2010.
- [59] Moncef Khairallah, S Ben Yahia, Adnene Toumi, Bechir Jelliti, Chawki Loussaief, F Ben Romdhane, Riadh Messaoud, and Mohamed Chakroun. Ocular manifestations associated with murine typhus. *British Journal of Ophthalmology*, 93(7):938–942, 2009.
- [60] Henry L Hudson, Allen B Thach, and Pedro F Lopez. Retinal manifestations of acute murine typhus. *International ophthalmology*, 21(3):121–126, 1997.
- [61] Tse-Min Lu, Benjamin I Kuo, Yu-Mei Chung, and Cheng-Yi Liu. Murine typhus presenting with multiple white dots in the retina. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 29(6):632–633, 1997.
- [62] JVS Pether, Wynne Jones, G Lloyd, DA Rutter, and M Barry. Fatal murine typhus from spain. *The Lancet*, 344(8926):897–898, 1994.
- [63] David H Walker, Francis M Parks, Thomas G Betz, Jeffery P Taylor, and Joan W Muehlberger. Histopathology and immunohistologic demonstration of the distribution of rickettsia typhi in fatal murine typhus. *American journal of clinical pathology*, 91(6):720–724, 1989.

- [64] George Chaliotis, Evangelos I Kritsotakis, Anna Psaroulaki, Yannis Tselentis, and Achilleas Gikas. Murine typhus in central greece: epidemiological, clinical, laboratory, and therapeutic-response features of 90 cases. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(8):e591–e596, 2012.
- [65] Guy H Palmer and Abdu F Azad. *Intracellular Pathogens II: Rickettsiales*, volume 2. American Society for Microbiology Press, 2012.
- [66] Ziqi Xu, Xiongchao Zhu, Qunying Lu, Xia Li, and Yewen Hu. Misdiagnosed murine typhus in a patient with multiple cerebral infarctions and hemorrhage: a case report. *BMC neurology*, 15(1):121, 2015.
- [67] RW Strandtmann and Dorothy J Eben. A survey of typhus in rats and rat ectoparasites in galveston, texas. *Texas reports on biology and medicine*, 11(1):144–51, 1953.
- [68] Harry D Pratt. The changing picture of murine typhus in the united states. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 70(1):516–527, 1958.
- [69] J Stephen Dumler, Jeffery P Taylor, and David H Walker. Clinical and laboratory features of murine typhus in south texas, 1980 through 1987. *Jama*, 266(10):1365–1370, 1991.
- [70] A Gikas, S Kokkini, C Tsioutis, D Athenessopoulos, E Balomenaki, S Blasak, C Matheou, Y Tselentis, and A Psaroulaki. Murine typhus in children: clinical and laboratory features from 41 cases in crete, greece. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(s2):211–212, 2009.
- [71] Michele Hernández-Cabrera et al. Murine typhus with renal involvement in canary islands, spain. *Emerging Infectious Disease*, 2004.
- [72] M Koliou, A Psaroulaki, C Georgiou, I Ioannou, Y Tselentis, and A Gikas. Murine typhus in cyprus: 21 paediatric cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(7):491–493, 2007.
- [73] Maria Mercedes Nogueras, Neus Cardenosa, Isabel Sanfeliu, Tomas Munoz, Bernat Font, and Ferran Segura. Serological evidence of infection with rickettsia typhi and rickettsia felis among the human population of catalonia, in the northeast of spain. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 74(1):123–126, 2006.
- [74] Yeon-Joo Choi. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, south korea. *Emerging Infectious Disease*, 2005.
- [75] Hanna Shalev, Rotkane Raissa, Zislin Evgenia, and Pablo Yagupsky. Murine typhus is a common cause of febrile illness in bedouin children in israel. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 38(6-7):451–455, 2006.

- [76] Mark D Zimmerman et al. Murine typhus and febrile illness, nepal. *Emerging Infectious Disease*, 2008.
- [77] Ar Kar Aung, Denis W Spelman, Ronan J Murray, and Stephen Graves. Rickettsial infections in southeast asia: implications for local populace and febrile returned travelers. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 91(3):451–460, 2014.
- [78] Momoyo Azuma. Murine typhus from vietnam, imported into japan. *Emerging Infectious Disease*, 2006.
- [79] Sugihiro Hamaguchi, Ngo Chi Cuong, Doan Thu Tra, Yen Hai Doan, Kenta Shimizu, Nguyen Quang Tuan, Lay-Myint Yoshida, Dang Duc-Anh, Shuji Ando, Jiro Arikawa, et al. Clinical and epidemiological characteristics of scrub typhus and murine typhus among hospitalized patients with acute undifferentiated fever in northern vietnam. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 92(5):972–978, 2015.
- [80] Philippe Parola, R Scott Miller, Philip McDaniel, Sam R Telford III, Jean-Marc Rolain, Chansuda Wongsrichanalai, and Didier Raoult. Emerging rickettsioses of the thailand-myanmar border. *Emerging infectious diseases*, 9(5):592–596, 2003.
- [81] Simaly Phongmany, Jean-Marc Rolain, Rattanaphone Phetsouvanh, Stuart D Blacksell, Vimone Soukhaseum, Bouachanh Rasachack, Khamphong Phiasakha, Surn Soukhaseum, Khamthavi Frichithavong, Vang Chu, Vally Keolouangkhout, Bertrand Martinez-Aussel, Ko Chang, Chirapha Darasavath, Oudayvone Rattanavong, Siho Sisouphone, Mayfong Mayxay, Sisouphane Vidamaly, Philippe Parola, Chanpheng Thammavong, Mayboun Heuangvongsy, Bounkong Syhavong, Didier Raoult, Nicholas J White, and Newton Paul N. Rickettsial infections and fever, vientiane. *Emerging Infectious Disease*, 196(2), 2006.
- [82] Emmanouil Angelakis, Elizabeth Botelho, Cristina Socolovski, Chantal Roure Sobas, Christophe Piketty, Philippe Parola, and Didier Raoult. Murine typhus as a cause of fever in travelers from tunisia and mediterranean areas. *Journal of travel medicine*, 17(5):310–315, 2010.
- [83] Tatjana Dill. High seroprevalence for typhus group rickettsiae, southwestern tanzania. *Emerging Infectious Disease*, 2013.
- [84] A Omezzine Letaïef, N Kaabia, M Chakroun, M Khalifa, N Bouzouaia, and L Jemni. Clinical and laboratory features of murine typhus in central tunisia: a report of seven cases. *International journal of infectious diseases*, 9(6):331–334, 2005.
- [85] Khamza Mokrani, Soraya Tebbal, Didier Raoult, and Pierre-Edouard Fournier. Human rickettsioses in the batna area, eastern algeria. *Ticks and tick-borne diseases*, 3(5):364–366, 2012.

- [86] Malavika Prabhu, William L Nicholson, Aubree J Roche, Gilbert J Kersh, Kelly A Fitzpatrick, Lindsay D Oliver, Robert F Massung, Anne B Morrissey, John A Bartlett, Jecinta J Onyango, et al. Q fever, spotted fever group, and typhus group rickettsioses among hospitalized febrile patients in northern tanzania. *Clinical Infectious Diseases*, 53(4):e8–e15, 2011.
- [87] Jaime E Fergie, Kevin Purcell, and Diane Wanat. Murine typhus in south texas children. *The Pediatric infectious disease journal*, 19(6):535–538, 2000.
- [88] SE Karpathy, EK Hayes, AM Williams, R Hu, L Krueger, S Bennett, A Tilzer, RK Velten, N Kerr, W Moore, et al. Detection of rickettsia felis and rickettsia typhi in an area of california endemic for murine typhus. *Clinical Microbiology and infection*, 15:218–219, 2009.
- [89] Luiz J Silva and Priscila MO Papaiordanou. Murine (endemic) typhus in brazil: case report and review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 46(5):283–285, 2004.
- [90] Jorge E Zavala-Castro, Karla R Dzul-Rosado, Gaspar Peniche-Lara, Raúl Tello-Martín, and Jorge E Zavala-Velázquez. Isolation of rickettsia typhi from human, mexico. *Emerging infectious diseases*, 20(8):1411, 2014.
- [91] Erana Gray, Polly Atatoa-Carr, Anita Bell, Sally Roberts, Daud Al Mudallal, and Graham D Mills. Murine typhus: a newly recognised problem in the waikato region of new zealand. *The New Zealand Medical Journal (Online)*, 120(1259), 2007.
- [92] Stephen Graves and John Stenos. Rickettsioses in australia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1166(1):151–155, 2009.
- [93] Stephanie L Jones, Eugene Athan, Daniel O Brien, Stephen R Graves, Chelsea Nguyen, and John Stenos. Murine typhus: the first reported case from victoria. *Medical Journal of Australia*, 180(9):482–482, 2004.
- [94] Constantinos Tsioutis, Maria Zafeiri, Asimakis Avramopoulos, Efthymia Prousalis, Michael Miligkos, and Spyridon A Karageorgos. Clinical and laboratory characteristics, epidemiology, and outcomes of murine typhus: A systematic review. *Acta Tropica*, 166:16–24, 2017.
- [95] Marylin Hidalgo, Viviana Montoya, Alejandra Martínez, Marcela Mercado, Alberto De la Ossa, Carolina Vélez, Gloria Estrada, Jorge E Pérez, Alvaro A Faccini-Martínez, Marcelo B Labruna, et al. Flea-borne rickettsioses in the north of caldas province, colombia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(5):289–294, 2013.

- [96] Anna Psaroulaki, Christos Christou, Dimosthenis Chochlakis, Ioanna Tsiligianni, Vasilios Sandalakis, Leonidas Georgalis, Ioannis Ioannou, Giorgos Giorgalas, and Yannis Tselentis. Murine typhus in cyprus: a 9-year survey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(8):489–495, 2012.
- [97] D Anyfantakis, S Doukakis, M Papadakis, D Triantafyllidou, K Bambili, G Polimili, and S Kastanakis. Liver function test abnormalities in murine typhus in greece: a retrospective study of 165 cases. *Le infezioni in medicina: rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive*, 21(3):207–210, 2013.
- [98] Philippe Brouqui, Andreas Stein, Hervé Tissot Dupont, Pierre Gallian, Sekene Badiaga, Jean Marc Rolain, Jean Louis Mege, Bernard La Scola, Philippe Berbis, and Didier Raoult. Ectoparasitism and vector-borne diseases in 930 homeless people from marseilles. *Medicine*, 84(1):61–68, 2005.
- [99] Sékéné Badiaga, Samir Benkouiten, Hind Hajji, Didier Raoult, and Philippe Brouqui. Murine typhus in the homeless. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35(1):39–43, 2012.
- [100] Marco H Schulze, Christian Keller, Andreas Müller, Uwe Ziegler, Heinz-Jakob Langen, Guido Hegasy, and August Stich. Rickettsia typhi infection with interstitial pneumonia in a traveler treated with moxifloxacin. *Journal of clinical microbiology*, 49(2):741–743, 2011.
- [101] Gaëlle Walter, Elisabeth Botelho-Nevers, Cristina Socolovschi, Didier Raoult, and Philippe Parola. Murine typhus in returned travelers: a report of thirty-two cases. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(6):1049–1053, 2012.
- [102] Charles D Ericsson, Mogens Jensenius, Pierre-Edouard Fournier, and Didier Raoult. Rickettsioses and the international traveler. *Clinical Infectious Diseases*, 39(10):1493–1499, 2004.
- [103] Yassina Bechah, Christian Capo, Jean-Louis Mege, and Didier Raoult. Rickettsial diseases: from rickettsia–arthropod relationships to pathophysiology and animal models. *Future Medicine*, 2008.
- [104] Rong Fang, Nahed Ismail, and David H Walker. Contribution of nk cells to the innate phase of host protection against an intracellular bacterium targeting systemic endothelium. *The American journal of pathology*, 181(1):185–195, 2012.
- [105] David H Walker, Vsevolod L Popov, Julie Wen, and HM Feng. Rickettsia conorii infection of c3h/hen mice. a model of endothelial-target rickettsiosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 70(3):358–368, 1994.

- [106] David H Walker, Vsevolod L Popov, and Hui-Min Feng. Establishment of a novel endothelial target mouse model of a typhus group rickettsiosis: evidence for critical roles for gamma interferon and cd8 t lymphocytes. *Laboratory investigation*, 80(9):1361–1372, 2000.
- [107] GW Anderson and Joseph V Osterman. Host defenses in experimental rickettsialpox: genetics of natural resistance to infection. *Infection and immunity*, 28(1):132–136, 1980.
- [108] Britton J Grasperge, Kathryn E Reif, Timothy D Morgan, Piyanate Sunyakumthorn, Joseph Bynog, Christopher D Paddock, and Kevin R Macaluso. Susceptibility of inbred mice to rickettsia parkeri. *Infection and immunity*, 80(5):1846–1852, 2012.
- [109] Christine S Eisemann, Matthew J Nypaver, and Joseph V Osterman. Susceptibility of inbred mice to rickettsiae of the spotted fever group. *Infection and immunity*, 43(1):143–148, 1984.
- [110] AE Crist, CL Wisseman, and JR Murphy. Characteristics of rickettsia mooseri infection of normal and immune mice. *Infection and immunity*, 43(1):38–42, 1984.
- [111] Rong Fang, Nahed Ismail, Lynn Soong, Vsevolod L Popov, Ted Whitworth, Donald H Bouyer, and David H Walker. Differential interaction of dendritic cells with rickettsia conorii: impact on host susceptibility to murine spotted fever rickettsiosis. *Infection and immunity*, 75(6):3112–3123, 2007.
- [112] Adrian N Billings, Hui-Min Feng, Juan P Olano, and David H Walker. Rickettsial infection in murine models activates an early anti-rickettsial effect mediated by nk cells and associated with production of gamma interferon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(1):52–56, 2001.
- [113] Hui-Min Feng, Julie Wen, and David H Walker. Rickettsia australis infection: a murine model of a highly invasive vasculopathic rickettsiosis. *The American journal of pathology*, 142(5):1471, 1993.
- [114] Anke Osterloh, Stefanie Papp, Kristin Moderzynski, Svenja Kuehl, Ulricke Richardt, and Bernhard Fleischer. Persisting rickettsia typhi causes fatal central nervous system inflammation. *Infection and immunity*, 84(5):1615–1632, 2016.
- [115] Stefanie Papp, Kristin Moderzynski, Jessica Rauch, Liza Heine, Svenja Kuehl, Ulricke Richardt, Heidelinde Mueller, Bernhard Fleischer, and Anke Osterloh. Liver necrosis and lethal systemic inflammation in a murine model of rickettsia typhi infection: role of neutrophils, macrophages and nk cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8):e0004935, 2016.

- [116] Peter Mombaerts, John Iacomini, Randall S Johnson, Karl Herrup, Susumu Tonegawa, and Virginia E Papaioannou. Rag-1-deficient mice have no mature b and t lymphocytes. *Cell*, 68(5):869–877, 1992.
- [117] Sabine Dittrich, Sayaphet Rattanavong, Sue J Lee, Phonepasith Panyanivong, Scott B Craig, Suhella M Tulsiani, Stuart D Blacksell, David AB Dance, Audrey Dubot-Pérès, Amphone Sengduangphachanh, et al. Orientia, rickettsia, and leptospira pathogens as causes of cns infections in laos: a prospective study. *The Lancet Global Health*, 3(2):e104–e112, 2015.
- [118] R Masalha, Helena Merkin-Zaborsky, Mike Matar, Howard J Zirkin, Itzhak Wirguin, and Yuval O Herishanu. Murine typhus presenting as subacute meningoencephalitis. *Journal of neurology*, 245(10):665–668, 1998.
- [119] Khachornsakdi Silpapojakul, Chirapat Ukkachoke, Suebsai Krisanapan, and Kamkarn Silpapojakul. Rickettsial meningitis and encephalitis. *Archives of internal medicine*, 151(9):1753–1757, 1991.
- [120] Wai Lun Moy and Say Tat Ooi. Abducens nerve palsy and meningitis by rickettsia typhi. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 92(3):620–624, 2015.
- [121] Gayle C Bosma, R Philip Custer, and Melvin J Bosma. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301(5900):527–530, 1983.
- [122] GC Bosma, MT Davisson, NR Ruetsch, HO Sweet, LD Shultz, and MJ Bosma. The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. *Immunogenetics*, 29(1):54–57, 1989.
- [123] Gustavo Valbuena, Hui Min Feng, and David H Walker. Mechanisms of immunity against rickettsiae. new perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. *Microbes and infection*, 4(6):625–633, 2002.
- [124] Sanjeev K Sahni, Elena Rydkina, Suresh G Joshi, Lee Ann Sporn, and David J Silverman. Interactions of rickettsia rickettsii with endothelial nuclear factor- κ b in a cell-free system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1):635–641, 2003.
- [125] Dawn R Clifton, Elena Rydkina, Robert S Freeman, and Sanjeev K Sahni. Nf- κ b activation during rickettsia rickettsii infection of endothelial cells involves the activation of catalytic ikb kinases ikka and $\text{ikk}\beta$ and phosphorylation-proteolysis of the inhibitor protein ikba . *Infection and immunity*, 73(1):155–165, 2005.
- [126] Abul K Abbas, Andrew HH Lichtman, and Shiv Pillai. *Cellular and molecular immunology*. Elsevier Health Sciences, 2014.

- [127] Holger Heine and Egil Lien. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *International archives of allergy and immunology*, 130(3):180–192, 2003.
- [128] Shizuo Akira. Toll-like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40):38105–38108, 2003.
- [129] Kiyoshi Takeda, Tsuneyasu Kaisho, and Shizuo Akira. Toll-like receptors. *Annual review of immunology*, 21(1):335–376, 2003.
- [130] Fugen Aktan. inos-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life sciences*, 75(6):639–653, 2004.
- [131] Emil R Unanue. Secretory function of mononuclear phagocytes: a review. *The American journal of pathology*, 83(2):396, 1976.
- [132] 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(8):e3064, 2014.
- [133] MV Nelyubov. Astrakhan scrub typhus: Time course of infectious process according to electron microscopy findings. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 134(4):374–375, 2002.
- [134] Claire Smalley, Jeremy Bechelli, Dedee Rockx-Brouwer, Tais Saito, Sasha R Azar, Nahed Ismail, David H Walker, and Rong Fang. Rickettsia australis activates inflammasome in human and murine macrophages. *PloS one*, 11(6):e0157231, 2016.
- [135] Fabio Martinon, Annick Mayor, and Jürg Tschopp. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology*, 27:229–265, 2009.
- [136] Marco A Quevedo-Diaz, Chang Song, Yanbao Xiong, Haiyan Chen, Larry M Wahl, Suzana Radulovic, and Andrei E Medvedev. Involvement of tlr2 and tlr4 in cell responses to rickettsia akari. *Journal of leukocyte biology*, 88(4):675–685, 2010.
- [137] Jeffrey M Jordan, Michael E Woods, Juan Olano, and David H Walker. The absence of toll-like receptor 4 signaling in c3h/hej mice predisposes them to overwhelming rickettsial infection and decreased protective th1 responses. *Infection and immunity*, 76(8):3717–3724, 2008.
- [138] Charles A Janeway, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik. *Immunobiology: the immune system in health and disease*, volume 1. Current Biology Singapore, 1997.

- [139] Kristin Moderzynski, Stefanie Papp, Jessica Rauch, Liza Heine, Svenja Kuehl, Ulricke Richardt, Bernhard Fleischer, and Anke Osterloh. Cd4+ t cells are as protective as cd8+ t cells against rickettsia typhi infection by activating macrophage bactericidal activity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(11):e0005089, 2016.
- [140] Kristin Moderzynski, Liza Heine, Jessica Rauch, Stefanie Papp, Svenja Kuehl, Ulricke Richardt, Bernhard Fleischer, and Anke Osterloh. Cytotoxic effector functions of t cells are not required for protective immunity against fatal rickettsia typhi infection in a murine model of infection: Role of th1 and th17 cytokines in protection and pathology. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(2):e0005404, 2017.
- [141] 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.
- [142] Hui-Min Feng, Vsevolod L Popov, and David H Walker. Depletion of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in mice with rickettsia conorii-infected endothelium: impairment of rickettsicidal nitric oxide production resulting in fatal, overwhelming rickettsial disease. *Infection and immunity*, 62(5):1952–1960, 1994.
- [143] C Nathan and QW Xie. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269(19), 1994.
- [144] R Kamijo, H Harada, T Matsuyama, M Bosland, J Gerecitano, D Shapiro, J Le, SI Koh, T Kimura, and SJ Green. Requirement for transcription factor irf-1 in no synthase induction in macrophages. *Science*, 263(5153):1612–1615, 1994.
- [145] Naoki Koide, Mya Mya Mu, Ferdaus Hassan, Shamima Islam, Gantsetseg Tumurkhuu, Jargalsaikhan Dagvadorj, Yoshikazu Naiki, Isamu Mori, Tomoaki Yoshida, and Takashi Yokochi. Lipopolysaccharide enhances interferon- γ -induced nitric oxide (no) production in murine vascular endothelial cells via augmentation of interferon regulatory factor-1 activation. *Journal of endotoxin research*, 13(3):167–175, 2007.
- [146] Narayanan Parameswaran and Sonika Patial. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(2), 2010.
- [147] 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.
- [148] Dipanjan Chowdhury and Judy Lieberman. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual Review of Immunology*, 26:389–420, 2008.
- [149] Hui-Min Feng, Ted Whitworth, Juan P Olano, Vsevolod L Popov, and David H Walker. Fc-dependent polyclonal antibodies and antibodies to outer membrane proteins a and

- b, but not to lipopolysaccharide, protect scid mice against fatal rickettsia conorii infection. *Infection and immunity*, 72(4):2222–2228, 2004.
- [150] Richard H Kenyon and CE Pedersen. Immune responses to rickettsia akari infection in congenitally athymic nude mice. *Infection and immunity*, 28(2):310–313, 1980.
- [151] Gerard E Kaiko, Jay C Horvat, Kenneth W Beagley, and Philip M Hansbro. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper t-cell response? *Immunology*, 123(3):326–338, 2008.
- [152] Fernando O Martinez and Siamon Gordon. The m1 and m2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6(13.10):12703, 2014.
- [153] Robert G Kilbourn and Paula Belloni. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon γ in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(9):772–776, 1990.
- [154] Estelle Bettelli, Thomas Korn, Mohamed Oukka, and Vijay K Kuchroo. Induction and effector functions of th17 cells. *Nature*, 453(7198):1051–1057, 2008.
- [155] Peng Ye, Fred H Rodriguez, Suzanne Kanaly, Kim L Stocking, Jill Schurr, Paul Schwarzenberger, Peter Oliver, Weitao Huang, Ping Zhang, Jason Zhang, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung cxc chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *Journal of Experimental Medicine*, 194(4):519–528, 2001.
- [156] Stephane Ferretti, Olivier Bonneau, Gerald R Dubois, Carol E Jones, and Alexandre Trifilieff. Il-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: Il-15 as a possible trigger. *The Journal of Immunology*, 170(4):2106–2112, 2003.
- [157] Johanne Martel-Pelletier, François Mineau, Dragan Jovanovic, John A Di Battista, and Jean-Pierre Pelletier. Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor κ b together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: Possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (mapkapk). *Arthritis and Rheumatism*, 42(11):2399–2409, 1999.
- [158] Cheng-Yuan Kao, Yin Chen, Philip Thai, Shinichiro Wachi, Fei Huang, Christy Kim, Richard W Harper, and Reen Wu. Il-17 markedly up-regulates β -defensin-2 expression in human airway epithelium via jak and nf- κ b signaling pathways. *The Journal of Immunology*, 173(5):3482–3491, 2004.

- [159] Kerstin Wolk, Stefanie Kunz, Ellen Witte, Markus Friedrich, Khusru Asadullah, and Robert Sabat. Il-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*, 21(2):241–254, 2004.
- [160] Spencer C Liang, Xiang-Yang Tan, Deborah P Luxenberg, Riyez Karim, Kyriaki Dunussi-Joannopoulos, Mary Collins, and Lynette A Fouser. Interleukin (il)-22 and il-17 are co-expressed by th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *Journal of Experimental Medicine*, 203(10):2271–2279, 2006.
- [161] Clifford M Snapper, LM Pecanha, Alan D Levine, and James J Mond. Ige class switching is critically dependent upon the nature of the b cell activator, in addition to the presence of il-4. *The Journal of Immunology*, 147(4):1163–1170, 1991.
- [162] Kelly D Stone, Calman Prussin, and Dean D Metcalfe. Ige, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2):S73–S80, 2010.
- [163] Hui-min Feng, Vsevolod L Popov, Gbo Yuoh, and David H Walker. Role of t lymphocyte subsets in immunity to spotted fever group rickettsiae. *The Journal of Immunology*, 158(11):5314–5320, 1997.
- [164] H Li, TR Jerrells, GL Spitalny, and DH Walker. Gamma interferon as a crucial host defense against rickettsia conorii in vivo. *Infection and immunity*, 55(5):1252–1255, 1987.
- [165] David H Walker, Juan P Olano, and Hui-Min Feng. Critical role of cytotoxic t lymphocytes in immune clearance of rickettsial infection. *Infection and immunity*, 69(3):1841–1846, 2001.
- [166] Sunil S Metkar, Baikun Wang, Miguel Aguilar-Santelises, Srikumar M Raja, Lars Uhlin-Hansen, Eckhard Podack, Joseph A Trapani, and Christopher J Froelich. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme b-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity*, 16(3):417–428, 2002.
- [167] Shigekazu Nagata and Pierre Golstein. The fas death factor. *Science*, 267(5203):1449, 1995.
- [168] Luk Van Parijs and Abul K Abbas. Role of fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Current opinion in immunology*, 8(3):355–361, 1996.
- [169] Sukhjit Takhar. Update on emerging infections: news from the centers for disease control and prevention. *Annals of emergency medicine*, 44(1):43–45, 2004.
- [170] Stefanie Papp, Jessica Rauch, Svenja Kuehl, Ulricke Richardt, Christian Keller, and Anke Osterloh. Comparative evaluation of two rickettsia typhi-specific quantitative real-time pcrs for research and diagnostic purposes. *Medical Microbiology and Immunology*, pages 1–11, 2016.

- [171] RS Sellers, CB Clifford, PM Treuting, and C Brayton. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Veterinary Pathology Online*, 49(1):32–43, 2012.
- [172] Charles D Mills, Kristi Kincaid, Jennifer M Alt, Michelle J Heilman, and Annette M Hill. M-1/m-2 macrophages and the th1/th2 paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12):6166–6173, 2000.
- [173] 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.
- [174] 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.
- [175] 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-1l and lag-3 rapidly clears established blood-stage plasmodium infection. *Nature immunology*, 13(2):188–195, 2012.
- [176] Daniel S McDermott and Steven M Varga. Quantifying antigen-specific cd4 t cells during a viral infection: Cd4 t cell responses are larger than we think. *The Journal of Immunology*, 187(11):5568–5576, 2011.
- [177] 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.
- [178] Beverly H Koller, Philippa Marrack, John W Kappler, and Oliver Smithies. Normal development of mice deficient in β_2m : Mhc class i proteins, and cd8+ t cells. *Science*, 1990.
- [179] Maarten Zijlstra, Mark Bix, Neil E Simister, Janet M Loring, David H Raulet, and Rudolf Jaenisch. β_2 -microglobulin deficient mice lack cd4- 8+ cytolytic t cells. *Nature*, 1990.
- [180] Dominic Cosgrove, David Gray, Andrée Dierich, Jim Kaufman, Marianne Lemeur, Christophe Benoist, and Diane Mathis. Mice lacking mhc class ii molecules. *Cell*, 66(5):1051–1066, 1991.
- [181] Michael J Grusby, Randall S Johnson, et al. Depletion of cd4+ t cells in major histocompatibility complex class ii-deficient mice. *Science*, 253(5026):1417, 1991.

- [182] Dipshikha Chakravorty and Michael Hensel. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and infection*, 5(7):621–627, 2003.
- [183] Yoshinori Imai, Iwao Ibata, Daisuke Ito, Keiko Ohsawa, and Shinichi Kohsaka. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class iii region encoding an ef hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochemical and biophysical research communications*, 224(3):855–862, 1996.
- [184] Daisuke Ito, Yoshinori Imai, Keiko Ohsawa, Kazuyuki Nakajima, Yasuo Fukuuchi, and Shinichi Kohsaka. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *iba1*. *Molecular brain research*, 57(1):1–9, 1998.
- [185] Dyana K Dalton, Sharon Pitts-Meek, Satish Keshav, Irene S Figari, Allan Bradley, Timothy A Stewart, et al. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- γ genes. *Science*, 260(5102):1739–1741, 1993.
- [186] Mark J Smyth and Joseph A Trapani. Granzymes: exogenous proteases that induce target cell apoptosis. *Immunology today*, 16(4):202–206, 1995.
- [187] Edward D Chan and David WH Riches. Potential role of the jnk/sapk signal transduction pathway in the induction of inos by $\text{tnf-}\alpha$. *Biochemical and biophysical research communications*, 253(3):790–796, 1998.
- [188] James R Murphy, CG Wiseman, and P Fiset. Mechanisms of immunity in typhus infection: adoptive transfer of immunity to rickettsia mooseri. *Infection and immunity*, 24(2):387–393, 1979.
- [189] FM Rollwagen, GA Dasch, and TR Jerrells. Mechanisms of immunity to rickettsial infection: characterization of a cytotoxic effector cell. *The Journal of Immunology*, 136(4):1418–1421, 1986.
- [190] Matthias Hauptmann, Julia Kolbaum, Stefanie Lilla, David Wozniak, Mohammad Gharaibeh, Bernhard Fleischer, and Christian A Keller. Protective and pathogenic roles of cd8^+ t lymphocytes in murine orientia tsutsugamushi infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(9):e0004991, 2016.
- [191] Erika Caro-Gomez, Michal Gazi, Maria A Cespedes, Yenny Goetz, Bruno Teixeira, and Gustavo Valbuena. Phenotype of the anti-rickettsia cd8^+ t cell response suggests cellular correlates of protection for the assessment of novel antigens. *Vaccine*, 32(39):4960–4967, 2014.
- [192] Joseph A Trapani and Mark J Smyth. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology*, 2(10):735–747, 2002.

Literaturverzeichnis

- [193] Frederick P Heinzel, Michael D Sadick, Bettie J Holaday, RL Coffman, and Richard M Locksley. Reciprocal expression of interferon or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. *J. exp. Med*, 169(59):199, 1989.
- [194] Ingo B Autenrieth, Meinrad Beer, Erwin Bohn, SH Kaufmann, and Jurgen Heesemann. Immune responses to yersinia enterocolitica in susceptible balb/c and resistant c57bl/6 mice: an essential role for gamma interferon. *Infection and immunity*, 62(6):2590–2599, 1994.
- [195] Walter R Weiss, Martha Sedegah, Richard L Beaudoin, Louis H Miller, and Michael F Good. Cd8+ t cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(2):573–576, 1988.
- [196] AL Rakhmievich. Evidence for a significant role of cd4+ t cells in adoptive immunity to listeria monocytogenes in the liver. *Immunology*, 82(2):249, 1994.
- [197] D Mitchell Magee, Dwight M Williams, Jeffrey G Smith, Cheryl A Bleicker, Barry G Grubbs, Julius Schachter, and Roger G Rank. Role of cd8 t cells in primary chlamydia infection. *Infection and immunity*, 63(2):516–521, 1995.
- [198] Richard P Morrison, Karen Feilzer, and Daniel B Tumas. Gene knockout mice establish a primary protective role for major histocompatibility complex class ii-restricted responses in chlamydia trachomatis genital tract infection. *Infection and immunity*, 63(12):4661–4668, 1995.
- [199] Lone Dons, Yuxuan Jin, Krister Kristensson, and Martin E Rottenberg. Axonal transport of listeria monocytogenes and nerve-cell-induced bacterial killing. *Journal of neuroscience research*, 85(12):2529–2537, 2007.
- [200] Robin J Goody, Cristen C Hoyt, and Kenneth L Tyler. Reovirus infection of the cns enhances inos expression in areas of virus-induced injury. *Experimental neurology*, 195(2):379–390, 2005.
- [201] Zhengbiao Bi, Maria Barna, Takashi Komatsu, and Carol S Reiss. Vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system activates both innate and acquired immunity. *Journal of virology*, 69(10):6466–6472, 1995.
- [202] Kathleen M Boje and Prince K Arora. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain research*, 587(2):250–256, 1992.
- [203] CC Chao, Shuxian Hu, TW Molitor, EG Shaskan, and PK Peterson. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *The Journal of Immunology*, 149(8):2736–2741, 1992.

- [204] Jean E Merrill, Louis J Ignarro, Michael P Sherman, Judy Melinek, and Thomas E Lane. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *The Journal of Immunology*, 151(4):2132–2141, 1993.
- [205] Bradley T Hyman, Kristin Marzloff, Julia J Wenniger, Ted M Dawson, David S Bredt, and Solomon H Snyder. Relative sparing of nitric oxide synthase-containing neurons in the hippocampal formation in alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 32(6):818–820, 1992.
- [206] Celia F Brosnan, Luca Battistini, Cedric S Raine, Dennis W Dickson, Arturo Casadevall, and Sunhee C Lee. Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. *Developmental neuroscience*, 16(3-4):152–161, 1994.
- [207] Craig M Walsh, Mehrdad Matloubian, Chau-Ching Liu, Roanne Ueda, Carole G Kurahara, Julie L Christensen, MT Huang, JD Young, Rafi Ahmed, and WR Clark. Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23):10854–10858, 1994.
- [208] David Kaegi, Birgit Ledermann, Kurt Buerki, Peter Seiler, Bernhard Odermatt, Kristin J Olsen, Eckhard R Podack, Rolf M Zinkernagel, and Hans Hengartner. Cytotoxicity mediated by t cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 1994.
- [209] S Arango-Jaramillo, A Farhang-Azad, and CL Wisseman Jr. Experimental infection with rickettsia mooseri and antibody response of adult and newborn laboratory rats. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 33(5):1017–1025, 1984.
- [210] Jeremy S Duffield. The inflammatory macrophage: a story of jekyll and hyde. *Clinical science*, 104(1):27–38, 2003.
- [211] Jenifer Turco and Herbert H Winkler. Role of the nitric oxide synthase pathway in inhibition of growth of interferon-sensitive and interferon-resistant rickettsia prowazekii strains in 1929 cells treated with tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infection and immunity*, 61(10):4317–4325, 1993.
- [212] E Manor and I Sarov. Inhibition of rickettsia conorii growth by recombinant tumor necrosis factor alpha: enhancement of inhibition by gamma interferon. *Infection and immunity*, 58(6):1886–1890, 1990.
- [213] Zhengbin Yao, William C Fanslow, Michael F Seldin, Anne-Marie Rousseau, Sally L Painter, Michael R Comeau, Jeffrey I Cohen, and Melanie K Spriggs. Herpesvirus saimiri encodes a new cytokine, il-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, 3(6):811–821, 1995.

- [214] Francois Fossiez, Odile Djossou, Pascale Chomarat, Leopoldo Flores-Romo, Smina Ait-Yahia, Corien Maat, Jean-Jacques Pin, Pierrc Garrone, Eric Garcia, Sem Saeland, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *The Journal of experimental medicine*, 183(6):2593–2603, 1996.
- [215] Heon Park, Zhaoxia Li, Xuexian O Yang, Seon Hee Chang, Roza Nurieva, Yi-Hong Wang, Ying Wang, Leroy Hood, Zhou Zhu, Qiang Tian, et al. A distinct lineage of cd4 t cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology*, 6(11):1133–1141, 2005.
- [216] Shean J Aujla, Yvonne R Chan, Mingquan Zheng, Mingjian Fei, David J Askew, Derek A Pociask, Todd A Reinhart, Florencia McAllister, Jennifer Edeal, Kristi Gaus, et al. Il-22 mediates mucosal host defense against gram-negative bacterial pneumonia. *Nature medicine*, 14(3):275–281, 2008.
- [217] Yan Zheng, Patricia A Valdez, Dimitry M Danilenko, Yan Hu, Susan M Sa, Qian Gong, Alexander R Abbas, Zora Modrusan, Nico Ghilardi, Frederic J De Sauvage, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature medicine*, 14(3):282–289, 2008.
- [218] Michelle N Kelly, Jay K Kolls, Kyle Happel, Joseph D Schwartzman, Paul Schwarzenberger, Crescent Combe, Magali Moretto, and Imtiaz A Khan. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against toxoplasma gondii infection. *Infection and immunity*, 73(1):617–621, 2005.
- [219] Yinyao Lin, Shane Ritchea, Alison Logar, Samantha Slight, Michelle Messmer, Javier Rangel-Moreno, Lokesh Guglani, John F Alcorn, Heather Strawbridge, Sang Mi Park, et al. Interleukin-17 is required for t helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen francisella tularensis. *Immunity*, 31(5):799–810, 2009.
- [220] Satoru Hamada, Masayuki Umemura, Takeru Shiono, Kensho Tanaka, Ayano Yahagi, M Dilara Begum, Kiyotetsu Oshiro, Yuko Okamoto, Hisami Watanabe, Kazuyoshi Kawakami, et al. Il-17a produced by $\gamma\delta$ t cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. *The Journal of Immunology*, 181(5):3456–3463, 2008.
- [221] Yongci Zhang, Haiping Wang, Jianyun Ren, Xiaofei Tang, Ye Jing, Donghong Xing, Guosheng Zhao, Zhi Yao, Xi Yang, and Hong Bai. Il-17a synergizes with ifn- γ to upregulate inos and no production and inhibit chlamydial growth. *PLoS One*, 7(6):e39214, 2012.

- [222] Wai Lim Ling, Liang Jie Wang, John CH Pong, Allan SY Lau, and James CB Li. A role for interleukin-17a in modulating intracellular survival of mycobacterium bovis bacillus calmette–guérin in murine macrophages. *Immunology*, 140(3):323–334, 2013.
- [223] Teresa M Wozniak, Bernadette M Saunders, Anthony A Ryan, and Warwick J Britton. Mycobacterium bovis bcg-specific th17 cells confer partial protection against mycobacterium tuberculosis infection in the absence of gamma interferon. *Infection and Immunity*, 78(10):4187–4194, 2010.
- [224] Yoshiyuki Miyazaki, Shinjiro Hamano, Seng Wang, Yohei Shimanoe, Yoichiro Iwakura, and Hiroki Yoshida. Il-17 is necessary for host protection against acute-phase trypanosoma cruzi infection. *The Journal of Immunology*, 185(2):1150–1157, 2010.
- [225] Catherine W Cai, Jennifer R Blase, Xiuli Zhang, Christopher S Eickhoff, and Daniel F Hoft. Th17 cells are more protective than th1 cells against the intracellular parasite trypanosoma cruzi. *PLoS Pathogens*, 12(10):e1005902, 2016.
- [226] Jörg Stange, Matthew R Hepworth, Sebastian Rausch, Lara Zajic, Anja A Köhl, Catherine Uyttenhove, Jean-Christophe Renauld, Susanne Hartmann, and Richard Lucius. Il-22 mediates host defense against an intestinal intracellular parasite in the absence of ifn- γ at the cost of th17-driven immunopathology. *The Journal of Immunology*, 188(5):2410–2418, 2012.
- [227] Gregory F Sonnenberg, Meera G Nair, Thomas J Kirn, Colby Zaph, Lynette A Fouser, and David Artis. Pathological versus protective functions of il-22 in airway inflammation are regulated by il-17a. *Journal of Experimental Medicine*, 207(6):1293–1305, 2010.
- [228] Dragan V Jovanovic, John A Di Battista, Johanne Martel-Pelletier, François C Jolicœur, Yulan He, Mengkun Zhang, François Mineau, and Jean-Pierre Pelletier. Il-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, il- β and tnf- α , by human macrophages. *The Journal of Immunology*, 160(7):3513–3521, 1998.
- [229] Martine Chabaud, Patrick Garnerio, Jean-Michel Dayer, Pierre-André Guerne, François Fossiez, and Pierre Miossec. Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 12(7):1092–1099, 2000.
- [230] Judith Sylvester, Abdelhamid Liacini, Wen Qing Li, and Muhammad Zafarullah. Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase-3,-13 and aggrecanase-1 genes in articular chondrocytes. *Cellular signalling*, 16(4):469–476, 2004.
- [231] Marije I Koenders, Erik Lubberts, Birgitte Oppers-Walgreen, Liduine van den Bersseelaar, Monique M Helsen, Franco E Di Padova, Annemieke MH Boots, Hermann Gram,

Literaturverzeichnis

- Leo AB Joosten, and Wim B van den Berg. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing rankl and interleukin-1. *The American journal of pathology*, 167(1):141–149, 2005.
- [232] Vladimir Trajkovic, Stanislava Stosic-Grujicic, Tatjana Samardzic, Milos Markovic, Djordje Miljkovic, Zorica Ramic, and Marija Mostarica Stojkovic. Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes. *Journal of neuroimmunology*, 119(2):183–191, 2001.
- [233] Alexander LeGrand, Beverley Fermor, Christian Fink, David S Pisetsky, J Brice Weinberg, T Parker Vail, and Farshid Guilak. Interleukin-1, tumor necrosis factor α , and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin e2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis & Rheumatism*, 44(9):2078–2083, 2001.

Publikationen

2017 Moderzynski, K., Heine, L., Rauch, J., Papp, S., Kuehl, S., Richardt, U., Fleischer, B., & Osterloh, A.

Cytotoxic effector functions of T cells are not required for protective immunity against fatal *Rickettsia typhi* infection in a murine model of infection: Role of T_H1 and T_H17 cytokines in protection and pathology.

PLOS Neglected Tropical Diseases, 11(2), e0005404.

2016 Moderzynski, K., Papp, S., Rauch, J., Heine, L., Kuehl, S., Richardt, U., Fleischer, B., & Osterloh, A.

CD4⁺ T cells are as protective as CD8⁺ T Cells against *Rickettsia typhi* infection by activating macrophage bactericidal activity.

PLoS Neglected Tropical Diseases, 10(11), e0005089.

Papp, S., Moderzynski, K., Rauch, J., Heine, L., Kuehl, S., Richardt, U., Mueller, H., Fleischer, B., & Osterloh, A.

Liver necrosis and lethal systemic inflammation in a murine model of *Rickettsia typhi* infection: role of neutrophils, macrophages and NK cells.

PLoS Negl Trop Dis, 10(8), e0004935.

Osterloh, A., Papp, S., Moderzynski, K., Kuehl, S., Richardt, U., & Fleischer, B.

Persisting *Rickettsia typhi* causes fatal central nervous system inflammation.

Infection and immunity, 84(5), 1615-1632.

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Bernhard Fleischer** für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Immunologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin bedanken. Zugleich danke ich Prof. Dr. Fleischer für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und für die konstruktiven Diskussionen.

Ein ebenso großer Dank geht an **Dr. Anke Osterloh** für die wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung der Arbeit, sowie für die unermüdliche und herzliche Unterstützung während der gesamten Zeit.

Prof. Dr. Julia Kehr danke ich ganz herzlich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Dr. Stefanie Papp, Dr. Jessica Rauch, Liza Heine, Svenja Kühl** und **Ulricke Richardt** für die angenehme Zusammenarbeit und außerordentliche Hilfsbereitschaft bedanken. Eine bessere Arbeitsatmosphäre hätte ich mir nicht wünschen können.

Ich danke allen Kollegen der Abteilung Immunologie, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Ein besonderer Dank geht dabei an **Dr. Thomas Jacobs, Dr. Minka Breloer** und **Christiane Steeg**.

Darüber hinaus danke ich **Dr. Stefanie Lilla** und den „Jacob Sisters“, **Dr. Annemieke Abel, Franziska Muskate, Imke Liebold** und **Rosa Grote-Galvez** für Gespräche, Anregungen sowie für eine tolle Büronachbarschaft.

Bei **Yvonne Richter, Meryem Küçük, Arshad Ali, Constantin Pretnar** und **Aline Adam** möchte ich mich herzlich für die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen rund um das tierexperimentelle Arbeiten bedanken.

Meiner Familie und **meinen Freunden** danke ich für die liebevolle Unterstützung und das Verständnis während der gesamten Promotionszeit. Der größte Dank gilt dabei **meiner Mutter**, die mir in jeder Hinsicht bedingungslos geholfen hat.