

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
des Universitätsklinikums Freiburg

Eingereicht über das
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Immunologische Kontrolle
von *Anaplasma phagocytophilum*
durch murine neutrophile Granulozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kathrin Gussmann
Tierärztin aus Freiburg im Breisgau

Berlin 2015

Journal-Nr.: 3807

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Georg Häcker
Dritter Gutachter: PD Dr. Jürgen Krücken

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
Rickettsiales, Anaplasma phagocytophilum, anaplasmoses, neutrophils,
in vitro, deficiency, immunity, reverse transcriptase PCR

Tag der Promotion: 22.12.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-705-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> und granulozytäre Anaplasmosen im Überblick	1
1.2 Geschichte	1
1.3 Taxonomie	2
1.4 Übertragung	2
1.5 Epidemiologie in Deutschland	2
1.6 Reservoirwirte	3
1.7 Intraspezies-Variabilität von <i>A. phagocytophilum</i>	4
1.8 Klinische Symptomatik und Laborbefunde	5
1.8.1 Tick-borne-fever	5
1.8.2 Equine granulozytäre Anaplasmosen	5
1.8.3 Canine granulozytäre Anaplasmosen	6
1.8.4 Feline granulozytäre Anaplasmosen	6
1.8.5 Humane granulozytäre Anaplasmosen	6
1.9 Diagnostik und Therapie	7
1.10 Morphologie	8
1.11 Invasion	9
1.12 Replikation	9
1.13 Tier- und Zellkulturmodelle	10
1.14 Neutrophile Granulozyten bei der Erregerkontrolle	11
1.15 Die angeborene und die erworbene Immunantwort	13
2 Fragestellung und Zielsetzung	17
3 Material und Methoden	19
3.1 Mäuse	19
3.2 Bakterienstamm und Zelllinien	19
3.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
3.4 Primer und Sonden	21
3.5 Geräte	21
3.6 Zusammensetzung der Zellkulturmedien	22
3.7 Gewinnung des SCF- und GM-CSF-Überstandes	23
3.8 Bestimmung der Infektionsrate und der Zellzahl	23
3.9 Produktion des Virusüberstandes	23
3.10 Gewinnung von Progenitoren und retrovirale Transduktion	24
3.11 DNA-Präparation aus Vorläufer-Zelllinien	25
3.12 Genotypisierung der Zelllinien	25

3.13 Zellkultur	29
3.14 Anzucht von <i>A. phagocytophilum</i>	30
3.15 Versuchsaufbau	30
3.16 RNA-Isolierung	31
3.17 Umschreiben von RNA in cDNA.....	32
3.18 TaqMan Real-time PCR	32
3.19 Zytokin- bzw. Chemokin-Analyse mittels Durchflusszytometrie	33
3.20 Nachweis von Nitrit im Zellkultur-Überstand	33
3.21 Statistische Auswertung	34
4 Ergebnisse	35
4.1 Wachstumsverlauf in murinen Wildtyp <i>Hoxb8</i> -Granulozyten	35
4.2 Die Beeinflussung des Wachstumsverlaufes von <i>A. phagocytophilum</i> durch einen Waschschrift 4 h nach Infektion	37
4.3 Die Zytokinproduktion von murinen Wildtyp <i>Hoxb8</i> -Granulozyten nach Infektion mit <i>A. phagocytophilum</i>	38
4.4 Die Bedeutung antimikrobieller Effektormechanismen muriner neutrophiler Granulozyten bei der Erregerkontrolle	42
4.5 Die Funktion von murinen Wildtyp <i>Hoxb8</i> -Makrophagen bei der Infektion durch <i>A. phagocytophilum</i>	50
4.6 Die Bedeutung antimikrobieller Effektormechanismen von murinen <i>Hoxb8</i> -Makrophagen bei der Infektion mit <i>A. phagocytophilum</i>	54
4.7 Die Bedeutung von IFN- γ bei der Kontrolle von <i>A. phagocytophilum</i>	61
4.8 Die Spezifität des IFN- γ -abhängigen Mechanismus bei der Wachstumshemmung von <i>A. phagocytophilum</i>	67
4.9 Die Bedeutung der iNOS bei der Wachstumshemmung von <i>A. phagocytophilum</i> in mit IFN- γ stimulierten murinen <i>Hoxb8</i> -Granulozyten	71
5 Diskussion	75
6 Zusammenfassung	85
7 Summary	87
8 Literaturverzeichnis	89
9 Publikationsverzeichnis	107
10 Danksagung.....	108
11 Selbständigkeitserklärung	109

Abkürzungsverzeichnis

16S rRNA	16 Svedberg ribosomale Ribonukleinsäure
Ats-1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> translocated substrate 1
bp	Basenpaare
CBA	Cytometric Bead Array
cDNA	complementary (komplementäre) DNA
CGA	canine granulozytäre Anaplasiose
CHO-Zellen	Chinesische Hamster Ovarzellen
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGA	equine granulozytäre Anaplasiose
ELISA	enzyme-linked immunosorbant assay
FCS	Fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
gp91 ^{phox}	Untereinheit der NADPH-Oxidase
HGA	humane granulozytäre Anaplasiose
HL60-Zellen	humane promyelozytische Leukämie-Zelllinie
HPLC	high performance liquid chromatography
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IFN- γ	Interferon- γ
IFN- γ R	Interferon- γ Rezeptor
IFT	Immunfluoreszenztest
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
KC	keratinocyte-derived chemokine
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MIG	monokine induced by gamma-interferon
MIP	macrophage inflammatory protein
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
Msp2	major surface protein-2
msp2	Gen des Msp2
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen

NO	Stickstoffmonoxid
NOD	nukleotid binding oligomerization domain (Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PSGL-1	P-selectin glykoprotein ligand 1
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor
SCID	severe combined immunodeficiency (schwere kombinierte Immundefizienz)
SPF	spezifisch pathogenfrei
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBF	Tick-borne-fever
TLR	Toll-like-Rezeptor (Toll-ähnliche-Rezeptor)
TNF	Tumornekrosefaktor

Einheiten

°C	Grad Celsius
G	Gauge
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
M	Molar
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
ng	Nanogramm

rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde, Sekunden
U	unit, units (Einheit, Einheiten)

Hinweise:

Im Folgenden werden die hier aufgeführten Termini i.d.R. in einem Kapitel zunächst ausgeschrieben, dann abgekürzt verwendet. Die im Rechtschreibduden enthaltenen Abkürzungen werden hier nicht explizit erläutert.

1 Einleitung

1.1 *Anaplasma phagocytophilum* und granulozytäre Anaplasmosose im Überblick

A. phagocytophilum ist ein obligat intrazelluläres Gram-negatives Bakterium, das sich in vivo ausschließlich in neutrophilen Granulozyten seines Wirtes vermehrt [1]. Es wird durch Zecken des *Ixodes ricinus*-Komplexes auf Tiere und Menschen übertragen. Der Hauptvektor in Europa ist *I. ricinus* [2]. Empfänglich sind vor allem Schafe, Rinder, Ziegen, Pferde, Hunde und Katzen sowie der Mensch [2, 3].

Während *A. phagocytophilum* in der Veterinärmedizin bereits seit 1932 als Erreger des Tick-borne-fever (TBF) bei Schafen bekannt ist [4], wurde eine humane Erkrankung erstmals 1994 beobachtet [5]. Die granulozytäre Anaplasmosose verläuft beim Tier und beim Menschen als fieberhafte Allgemeinerkrankung.

1.2 Geschichte

Das Krankheitsbild der granulozytären Anaplasmosose wurde erstmals 1932 als TBF bei Schafen in Schottland beschrieben [4]. 1950 wurde die Erkrankung bei Rindern [6] und 1969 bei Ziegen [7] beobachtet. Es zeigte sich, dass das TBF auch im übrigen Europa verbreitet ist, während es in Nordamerika bislang nicht beobachtet wurde [3].

Die Empfänglichkeit von Pferden [8] und Hunden [9] für eine *A. phagocytophilum*-Infektion wurde erstmals in den USA 1969 bzw. 1982 beschrieben, doch es schlossen sich schnell Fallberichte aus Europa an [10, 11]. Eine Infektion bei Katzen wurde zum ersten Mal 1999 in Schweden nachgewiesen [12], nachfolgend wurden vereinzelte Fälle im übrigen Europa und Nordamerika beobachtet [13].

Erst 1994 wurde in den USA erkannt, dass *A. phagocytophilum* auch als Erreger beim Menschen vorkommt [5]. Seitdem wurden in Nordamerika steigende Fallzahlen an humaner granulozytärer Anaplasmosose (HGA) registriert [14]. In Europa hingegen scheint die HGA deutlich seltener diagnostiziert zu werden [15, 16].

1.3 Taxonomie

Basierend auf phylogenetischen Studien kam es 2001 zu einer Revision der Taxonomie innerhalb der Ordnung der *Rickettsiales* [17]: Die früheren Spezies *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi* und das Agens der humanen granulozytären Ehrlichiose wurden aufgrund molekularer und antigenetischer Verwandtschaft zu einer einzigen Spezies *A. phagocytophilum* zusammengefasst.

1.4 Übertragung

Die der Familie *Anaplasmataceae* zugehörigen Mikroorganismen zählen zu den obligat intrazellulären Bakterien und haben gemeinsam, dass sie in der Regel durch Vektoren, vor allem durch Zecken übertragen werden [17]. Die klassische Übertragung durch die Zecke erfolgt für *A. phagocytophilum* ca. 24 bis 48 h nach dem Zeckenstich [18, 19].

A. phagocytophilum wird durch Schildzecken der Gattung *Ixodes* übertragen. Zu den Hauptvektoren zählen in den USA *I. scapularis* und *I. pacificus*, in Europa *I. ricinus* und in Asien *I. persulcatus*. Der Erreger wurde jedoch auch in weiteren, den Schildzecken (*Ixodidae*) zugehörigen Arten nachgewiesen. Ob diese jedoch als potentielle Vektoren in Frage kommen, bedarf weiterer Untersuchungen [20].

Neben der klassischen Übertragung von *A. phagocytophilum* durch Vektoren sind beim Menschen sowohl perinatale Infektionen [21, 22] als auch Übertragungen durch Bluttransfusionen berichtet worden [23-26]. Eine in China beschriebene nosokomiale Transmission erscheint jedoch sehr fragwürdig [27, 28]; vielmehr dürfte es sich dabei um Infektionen mit einem neu entdeckten Bunya-Virus gehandelt haben [29-31].

Für den veterinärmedizinischen Bereich wurde gezeigt, dass eine perinatale Infektion beim Hund nicht vorzukommen scheint [32]. Beim Rind wurde allerdings kürzlich eine spontane intrauterine Infektion beschrieben [33].

1.5 Epidemiologie in Deutschland

Die ersten Fälle von granulozytärer Anaplasrose wurden in Deutschland im Vergleich mit vielen anderen Ländern erst zeitlich verzögert diagnostiziert. Dies ist überraschend, da die

Prävalenz von *A. phagocytophilum* bei *I. ricinus* Zecken in Deutschland mit der in anderen europäischen Ländern vergleichbar ist [2] und etwa zwischen 1,6% bis 4,1% liegt [34-36].

Die equine granulozytäre Anaplasmose (EGA) wurde in Deutschland erstmals 1984 beim Pferd diagnostiziert [37], 2003 erfolgte der erstmalige molekulare Nachweis [38]. Von der caninen granulozytären Anaplasmose (CGA) wurde zum ersten Mal 2007 in Deutschland berichtet [39]. Die erkrankten Pferde und Hunde entwickelten sowohl die für die Infektion charakteristischen klinischen Symptome als auch entsprechende hämatologische Veränderungen. Im Gegensatz dazu wurde 2011 eine Infektionsrate von 4% bei Schafen ermittelt, welche jedoch asymptomatisch waren [40]. Zuletzt wurde *A. phagocytophilum* in Deutschland bei Rindern nachgewiesen, welche die typischen Symptome der bei Schafen und Rindern als TBF bezeichneten Erkrankung zeigten [33, 41]. Hingegen ist die feline granulozytäre Anaplasmose in Deutschland nicht bestätigt, obgleich sie in der Schweiz und Österreich [42, 43] bereits nachgewiesen worden ist.

In Deutschland beträgt die Seroprävalenz beim Menschen bei Normalpersonen 1,9% bis 2,6% und in Risikokollektiven 11,4% bis 18,4% [44, 45], doch ist die granulozytäre Anaplasmose beim Menschen in Deutschland bislang noch nicht sicher diagnostiziert worden. Dies steht im Widerspruch zum Vorkommen der HGA in anderen Ländern Europas sowie in Nordamerika und Asien [46]. Da die EGA [38, 47] und die CGA [39, 48, 49] jedoch in Deutschland beobachtet werden und beim Pferd und beim Hund die gleichen *A. phagocytophilum*-Stämme wie beim Menschen nachgewiesen sind [50], ist die HGA in Deutschland vermutlich unterdiagnostiziert. Dabei spielen wahrscheinlich der Bekanntheitsgrad der Erkrankung, deren unspezifische Symptome sowie subklinische Verläufe eine Rolle.

1.6 Reservoirwirte

Zecken der Gattung *Ixodes* besitzen ein breites Wirtsspektrum, das aus einer Vielzahl von wildlebenden Säugetieren und Vögeln besteht, und durchlaufen einen drei-wirtigen Lebenszyklus als Larve, Nymphe und adultes Tier [51]. *A. phagocytophilum* wird in Zecken der Gattung *Ixodes* transstadiell, jedoch nicht transovariell übertragen [52]. Daher kommen nur Nymphen sowie adulte Zecken als potentielle Überträger in Frage [53].

Um den Lebenszyklus des Erregers aufrechtzuerhalten, sind demnach natürliche Reservoirwirte notwendig. In den USA gilt insbesondere die Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*) als gesichertes Reservoir [54, 55]. Diskutiert wird ebenfalls, inwieweit Streifenhörnchen, Eich-

hörnchen, Buschratten und Weißwedelhirsche als potentielle Reservoirwirte agieren [2, 46, 55].

Für Europa ist die Situation wesentlich weniger klar. Obwohl *A. phagocytophilum* in einer Vielzahl von wildlebenden Spezies nachgewiesen wurde, ist deren Bedeutung als Reservoir nicht vollends gesichert [2]. Als wahrscheinliche Reservoirwirte kommen Hirsche, Wildschweine und Igel in Frage [50]. Neben wildlebenden Tieren wurde diskutiert, inwieweit domestizierte Tiere wie vor allem Hunde [56], aber auch Nutztiere wie Schafe und Rinder, die eine persistierende Infektion entwickeln, als Reservoir fungieren könnten [57].

1.7 Intraspezies-Variabilität von *A. phagocytophilum*

Es besteht ein deutlicher Wirtstropismus innerhalb der Spezies *A. phagocytophilum* [58]. Stämme, die von Menschen, Pferden, Rindern und Schafen isoliert wurden, zeigten in heterologen Wirtsspezies eine unterschiedliche Pathogenität und waren teilweise nicht in der Lage, in diesen eine klinisch apparente Infektion hervorzurufen [6, 59-64].

Darüber hinaus existieren ebenfalls ausgeprägte epidemiologische Unterschiede. In Europa ist das TBF eine häufig beschriebene Erkrankung [3, 57, 65], doch in Nordamerika ist bisher keine natürliche Infektion bei Rindern und Schafen nachgewiesen [3]. Demgegenüber steigt die Zahl der an HGA erkrankten Menschen in den USA stetig an [14], während die Erkrankung in Europa bislang vergleichsweise eher selten diagnostiziert worden ist [15, 16].

Um die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Beobachtungen zu erforschen, wurden unterschiedliche *A. phagocytophilum* Stämme molekulargenetisch charakterisiert [20, 46]. Studien in Nordamerika zeigten, dass der Stamm, der vorwiegend Wiederkäuer infiziert (Ap-V1), und ein humaner Stamm (Ap-ha) sich in zwei Basenpaaren im 16S-rRNA-Gen unterschieden [66-68]. Es sind jedoch weitere 16S rRNA Gen-Varianten beim Menschen nachgewiesen worden [40, 69], so dass offenbar nicht nur der Ap-ha Stamm in der Lage ist, Menschen zu infizieren. Zudem ist mehrfach belegt worden, dass für eine valide genetische Charakterisierung von *A. phagocytophilum* das 16S rRNA Gen nicht allein ausreichend ist [36, 40, 70-72].

Daher wurden weitere Methoden der genetischen Charakterisierung [20] einschließlich der Sequenzierung von Gesamt-Genom-Sequenzen entwickelt [73]. Mehrere Studien in Europa und den USA haben festgestellt, dass *A. phagocytophilum* Stämme von Menschen, Pferden und Hunden homolog sind [50, 73-76].

In Deutschland werden Infektionen bei Pferden [38, 47] und Hunden [39, 48, 49] beobachtet, nicht jedoch beim Menschen. Daraus lässt sich schließen, dass in Deutschland die Erkrankung beim Menschen vermutlich unterdiagnostiziert ist.

1.8 Klinische Symptomatik und Laborbefunde

Der klinische Verlauf der granulozytären Anaplasiose ist unterschiedlich ausgeprägt und reicht von selbstlimitierenden Infektionen bis hin zu Todesfällen. Hierbei spielen sowohl die Tierart, das Lebensalter, die beteiligte genetische Variante von *A. phagocytophilum* als auch die immunologische bzw. gesundheitliche Kondition eine entscheidende Rolle [2]. Die Inkubationszeit beträgt 4 bis 14 Tage nach dem Zeckenstich [3, 10, 11, 77].

1.8.1 Tick-borne-fever

Zu den charakteristischen Symptomen des TBF bei Rindern zählen hohes Fieber, Anorexie, Abgeschlagenheit, plötzlicher Milchrückgang, respiratorische Symptome sowie Ödeme im Bereich der Gliedmaßen und ein steifes Gangbild [3, 6, 41, 78]. Schafe entwickeln ähnlich wie Rinder eine unspezifische fieberhafte Allgemeinerkrankung. Ein Teil der infizierten Tiere zeigte jedoch keine ausgeprägten klinischen Symptome [57, 59, 65]. Insbesondere Lämmer sind aufgrund einer Immunsuppression infolge einer Infektion mit *A. phagocytophilum* deutlich empfänglicher gegenüber Sekundärinfektionen – wie z.B. mit *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella haemolytica* und *Listeria monocytogenes* [57]. Letale Krankheitsverläufe sind dadurch möglich [2, 57, 79]. Ebenfalls beschrieben sind Aborte bei trächtigen Schafen [2]. Interessanterweise kann *A. phagocytophilum* bei Schafen zu einer persistierenden Infektion führen [2]. Laborbefunde zeigen am häufigsten eine Neutropenie, eine Thrombopenie und eine Anämie [3, 65].

1.8.2 Equine granulozytäre Anaplasiose

Bei der EGA ist die Ausprägung der klinischen Symptomatik deutlich abhängig sowohl vom Alter der betroffenen Pferde als auch von deren gesundheitlichem Zustand und der Dauer der Erkrankung [80]. Insbesondere die über vier Jahre alten Pferde entwickeln typische Symptome wie Fieber, Apathie, Anorexie, Petechien, Ikterus, Gliedmaßenödeme, Ataxie und Lahmheit [47, 81, 82]. Interessanterweise sind vereinzelt eine kardiale Beteiligung [81, 83-85] und schwere neurologische Symptome im Zusammenhang mit einer EGA beschrieben

worden [80, 85]. Jüngere Pferde zeigen gegenüber älteren meist eine geringgradigere Ausprägung der genannten Symptome auf, außerdem verläuft die Infektion häufig selbst-limitierend [80]. Sekundäre Infektionen und Verletzungen in Folge einer beeinträchtigten Koordination können zu schwerwiegenden Verlaufsformen bis hin zu Todesfällen führen [81]. Wie auch bei anderen Tierarten können bei Pferden charakteristische hämatologische Veränderungen wie eine Leukopenie, Thrombopenie und eine Anämie sowie typische intrazytoplasmatische Morulae (Maulbeerformen) in neutrophilen Granulozyten auftreten [10].

1.8.3 Canine granulozytäre Anaplasiose

Die häufigsten Symptome der CGA sind Fieber, Anorexie, Bewegungsunlust sowie Lahmheit [11, 86, 87]. Des Weiteren sind in seltenen Fällen blasse Schleimhäute, Hämorrhagien, unproduktiver Husten, Polyurie, Polydipsie, neurologische Symptome, gastrointestinale Symptome wie insbesondere Durchfall und Erbrechen, Lymphadenopathie und Splenomegalie beschrieben. Die Infektion verläuft jedoch auch bei dieser Tierart häufig subklinisch [11, 48]. Zu den häufigsten Blutbildveränderungen zählen Thrombopenie, Leukopenie und Anämie [11]. Im Serum zeigen sich eine milde Hypoalbuminämie und teilweise erhöhte Werte der Leberenzyme [11].

1.8.4 Feline granulozytäre Anaplasiose

Bisher sind nur wenige *A. phagocytophilum*-Infektionen bei Katzen beschrieben [13]. Ähnlich der CGA zählen Fieber, Anorexie, Gewichtsverlust, Lethargie und Gelenkschmerzen zu den häufigsten Symptomen der feline granulozytären Anaplasiose [13]. Weitere unspezifische Symptome sind unter anderem Lahmheit, Tachypnoe, blasse Schleimhäute, Gingivitis, Konjunktivitis und neurologische Symptome wie Tremor und Inkoordination [42, 43, 88-90]. Ein kürzlich veröffentlichter Fallbericht beschreibt eine vermutlich durch die Thrombopenie verursachte Epistaxis bei einer Katze [90]. Typische Laborbefunde bestehen in einer Thrombopenie und einer Leukopenie [13].

1.8.5 Humane granulozytäre Anaplasiose

Die Infektion beim Menschen verläuft vermutlich meist asymptomatisch. Eine apparente Infektion führt zu unspezifischen Symptomen wie Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Muskel-

schmerzen. Weniger häufig treten gastrointestinale und respiratorische Symptome sowie Arthralgien auf [91]. Die Letalität ist niedrig und wird mit 0,6% angegeben [92]. Bei manifester Immunsuppression können sich schwerwiegende Krankheitsverläufe bis hin zu Todesfällen entwickeln [77]. Zu den häufigsten Laborveränderung zählen Thrombopenie, Leukopenie und erhöhte Transaminasen [77].

1.9 Diagnostik und Therapie

Für die Diagnose einer *A. phagocytophilum*-Infektion eignen sich vor allem der mikroskopische Direktnachweis im Giemsa-gefärbten Blutaussstrich sowie eine *A. phagocytophilum*-spezifische Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) aus EDTA-Blut. Demgegenüber ist für die Akutdiagnostik der Nachweis von Antikörpern mittels indirekten Immunfluoreszenztests (IFT) oder des SNAP4Ds-Tests der Firma IDEXX weniger geeignet, da anhand einer einzelnen Serumprobe Durchseuchungstiter kaum von akuten Infektionen unterschieden werden können [93]. Die Serologie erlaubt jedoch eine retrospektive Diagnose anhand des Nachweises einer Titerbewegung zwischen Akut- und Rekonvaleszenz-Serum [94-96].

Der direkte mikroskopische Nachweis intrazytoplasmatischer Morulae in neutrophilen Granulozyten ist sehr schnell und praktikabel. Nach einem positiven Befund kann zeitnah eine adäquate Therapie eingeleitet werden. Dennoch besitzt diese Methode eine sehr geringe Sensitivität und Spezifität. Zu berücksichtigen sind dabei insbesondere der geringe prozentuale Anteil infizierter neutrophiler Granulozyten, die Beurteilung eines lediglich geringen Anteils der zirkulierenden Blutzellen, das Auftreten von Morulae nur innerhalb der ersten Krankheitswoche, aber auch Fehlinterpretationen durch intrazelluläre Artefakte [94-96]. Des Weiteren ist die Verwendung von „buffy coats“ für die Mikroskopie von Vorteil, da hierdurch deren Sensitivität erhöht werden kann [94].

Die PCR-basierte Diagnostik, insbesondere die Real-Time PCR, ist deutlich sensitiver als die Mikroskopie [96]. Häufige Zielgene stellen das *groEL* Operon oder das „major surface protein 2“ (*msh2*)-Gen dar [96, 97].

Serologische Nachweismethoden werden häufig durchgeführt, diese sind jedoch in der akuten Phase einer Infektion wenig aussagekräftig [98]. Ein einmalig nachgewiesener positiver Titer ermöglicht – wie bereits erwähnt – keine Unterscheidung zwischen einer gegenwärtigen Infektion oder einem früheren Kontakt mit dem Erreger. Der Nachweis einer Serokonversion oder ein mindestens vierfacher Anstieg des Antikörper-Titers erlauben nur

eine retrospektive Diagnose, gelten aber als sehr sensitive Verfahren [98]. Die Nutzung des SNAP4Ds-Schnelltests stellt eine schnelle Alternative zum Antikörper-Nachweis mittels IFT dar und ist für epidemiologische Untersuchungen als Screeningtest geeignet [93]. Die Ergebnisse des SNAP4Ds-Schnelltest sollten jedoch durch ein anderes Verfahren bestätigt werden [99].

Eine weitere diagnostische Möglichkeit besteht in der Anzucht von *A. phagocytophilum* in verschiedenen Zelllinien. Am häufigsten werden HL60-Zellen eingesetzt [100]. Die Kultur von *A. phagocytophilum* wird jedoch nur von Spezial-Laboratorien angeboten.

Der Einsatz von Tetracyclinen, insbesondere von Doxycyclin sowie Oxytetracylin beim Pferd ermöglicht eine effektive Therapie der granulozytären Anaplasiose bei Tieren und Menschen [10, 11, 13, 77].

1.10 Morphologie

A. phagocytophilum ist ein 0,4 bis 1,4 µm großes pleomorphes, kokkoides, obligat intrazelluläres Bakterium mit einer Gram-negativem Zellwandstruktur [53]. Es repliziert in neutrophilen Granulozyten in einer intrazytoplasmatischen Vakuole. Innerhalb dieser bildet *A. phagocytophilum* Aggregate, die sogenannten Morulae, die lichtmikroskopisch erkennbar sind. Das Bakterium kann sich in zwei morphologisch unterschiedliche Strukturformen umwandeln [101]. Die infektiöse, auch als ‚dense-core‘ bezeichnete kleine dichte Form wird hauptsächlich bei der Anheftung des Erregers an die Wirtszelle beobachtet [102]. In der größeren retikulären Form ist der Erreger in der Lage, sich zu vermehren, und wandelt sich letztendlich wieder in die ‚dense core‘-Form um, welche nach der Zellyse freigesetzt wird und weitere Zellen infiziert [101, 103].

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein essentieller strukturgebender Zellwandbestandteil vieler Gram-negativer Bakterien. Da hingegen *A. phagocytophilum* lediglich von einer sehr dünnen gewellten äußeren Membran umgeben ist [104], lässt sich vermuten, dass *A. phagocytophilum* kein LPS besitzt. Diese These wurde durch eine Studie bekräftigt, nach der *A. phagocytophilum* keine Gene für die Biosynthese von Lipid A aufweist und dass *A. phagocytophilum* die meisten Gene des Peptidoglykan-Syntheseweges fehlen [105]. Um das Fehlen dieser strukturgebenden Zellwandbestandteile zu kompensieren, nutzt der Erreger vermutlich das Cholesterin der Wirtszelle [105]. Der Einbau von Cholesterin anstelle von LPS ist somit ein wichtiger Mechanismus des Erregers, um die Integrität seiner Zellmembran zu gewährleisten.

LPS zählt zu den wichtigen Pathogen-assoziierten molekularen Mustern und wird durch entsprechende Rezeptoren wie z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkannt, so dass eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems ermöglicht wird [106]. Das Fehlen dieses Liganden verbessert vermutlich das intrazelluläre Überleben von *A. phagocytophilum* [105, 107].

1.11 Invasion

A. phagocytophilum wird über Caveolae-abhängige Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen [108-110]. Der „P-selectin glykoprotein ligand 1“ (PSGL-1) ermöglicht eine Infektion humaner neutrophiler Granulozyten über eine Syk(spleen tyrosine kinase)- und ROCK 1(Rho-Kinase 1)-abhängige Signalkaskade [111]. Es werden jedoch weitere PSGL-1-unabhängige Wege vermutet – unter anderem mittels β 2-Intergrin und „lipid rafts“, wobei die genauen Signalwege bisher noch unbekannt sind [112].

Als entsprechende bakterielle Adhäsine konnten bislang sowohl das OmpA (outer membran protein A) als auch das „*A. phagocytophilum* surface protein 14-kDA“ (Asp14) genauer analysiert werden. Diese beiden Oberflächenproteine leiten dabei vermutlich zwei komplementäre, jedoch unabhängige Signaltransduktionswege ein und ermöglichen somit eine erfolgreiche Aufnahme in die Wirtszelle [113, 114]. Msp2 scheint ebenfalls an der Bindung von PSGL1 und damit beim Zelleintritt beteiligt zu sein [115, 116]. Weiterhin ist kürzlich das Invasin „*A. phagocytophilum* invasion protein A“ (AipA) identifiziert worden [117], welches ebenfalls für eine erfolgreiche Infektion der Zelle notwendig ist. Da eine Blockierung dieser Adhäsine bzw. Invasine eine Infektion durch *A. phagocytophilum* in vitro verhindert, könnten diese zur Impfstoffentwicklung genutzt werden [117].

1.12 Replikation

A. phagocytophilum repliziert in vivo ausschließlich in neutrophilen Granulozyten [1]. In-vitro-Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass der Erreger ebenfalls Endothel- und Mastzellen sowie eine Megakaryozyten-Zelllinie infizieren kann [118-120]. In Richtung Monozyten-Makrophagen differenzierte HL60-Zellen [121] sowie murine Knochenmarks-Makrophagen [122] unterstützen allerdings die Replikation von *A. phagocytophilum* nicht. Obwohl im Gewebe von SCID-Mäusen eine Kolokalisation von Erreger- und Endothelzell-Antigenen [123] beobachtet wurde, ist die Rolle von Endothelzellen während des Replikationszyklus von *A. phagocytophilum* bislang unklar. *A. phagocytophilum* vermehrt sich nach Rezeptor-

vermittelter Endozytose innerhalb einer zytoplasmatischen Vakuole, die nicht zum Phago-lysosom reift [124, 125].

Die Autophagie eukaryotischer Zellen ist ein wichtiger Abwehrmechanismus gegen unterschiedliche Krankheitserreger [126]. Die Replikationsvakuole von *A. phagocytophilum* besitzt verschiedene Marker eines frühen Autophagosoms [127]. Vermutlich induziert *A. phagocytophilum* die Autophagie sogar aktiv, um Nährstoffe zu akquirieren [128]. Zudem ist der Erreger in der Lage, über unterschiedliche, noch nicht vollständig geklärte Mechanismen die Wirtszelle zu manipulieren, um mit notwendigen Nährstoffen versorgt zu werden [112]. Beispielsweise ermöglichen ein Typ4-Sekretions-System und der entsprechende Effektor, das „*A. phagocytophilum* translocated substrate 1“ (Ats-1), durch die Bildung weiterer Autophagosomen, notwendige Nährstoffe aus der Wirtszelle in die Vakuole zu transportieren [128].

Neutrophile Granulozyten haben eine sehr kurze Lebenszeit. Um zu replizieren, verzögert daher *A. phagocytophilum* die Apoptose seiner Wirtszellen, und zwar sowohl durch Manipulation extrinsischer wie intrinsischer Signalwege [1] als auch durch Hochregulation anti-apoptotischer und Herunterregulation pro-apoptotischer Gene [129-133] sowie durch eine verminderte Induktion von pro-apoptotischen Genen [134]. Weitere Mechanismen umfassen unter anderem die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials [135], die Inhibition der Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 8 [135, 136], die Verhinderung der Translokation des pro-apoptotischen Proteins Bax (B-cell lymphoma 2-associated X protein) in die Mitochondrien [136] und die Blockade der Fas-induzierten Apoptose [136]. Das bereits erwähnte Ats-1 verhindert eine mitochondriale Antwort auf apoptotische Signale und wirkt somit ebenfalls anti-apoptotisch [137]. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass die *A. phagocytophilum*-Infektion von Granulozyten sowohl zu einer Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweges als auch zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B) führt. Letztlich kommt es zu einer verstärkten Sekretion von Interleukin(IL)-8, das wiederum die spontane Apoptose neutrophiler Granulozyten verzögert [138]. Darüber hinaus ermöglicht die Freisetzung von IL-8 die Rekrutierung weiterer neutrophiler Granulozyten [139].

1.13 Tier- und Zellkulturmodelle

Die klinischen Symptome der granulozytären Anaplasiose bei Pferden, Hunden und Schafen sind vergleichbar mit denen einer HGA; daher sind unter anderem diese Tierarten als Modellorganismen genutzt worden, um neue Erkenntnisse zu *A. phagocytophilum* zu

erhalten [140]. Aufgrund der einfacheren Handhabung von Labormäusen wurde jedoch meist das Mausmodell für In-vivo-Studien genutzt [141]. Wildtypmäuse zeigen im Unterschied zu den vorher genannten Tierarten keine klinische Erkrankung [142, 143], und der Erreger wird nach ca. zwei Wochen eliminiert [107, 142]. Die Tiere entwickeln jedoch die für die granulozytäre Anaplasiose charakteristischen Blutbildveränderungen wie Thrombopenie, Leukopenie und Anämie [143-145].

An primären neutrophilen Granulozyten sind bisher für In-vitro-Untersuchungen vor allem solche humaner oder oviner Herkunft verwendet worden [1], da die Gewinnung primärer muriner neutrophiler Granulozyten ex vivo mit Schwierigkeiten verbunden ist. Die Aufreinigung primärer muriner neutrophiler Granulozyten ermöglicht teilweise nur einen Reinheitsgrad von 80% bis 85% [146]. Zu berücksichtigen sind ferner sowohl deren sehr kurze Lebensdauer als auch die geringe Zellausbeute [146, 147].

Aufgrund der beschränkten Lebensdauer von primären neutrophilen Granulozyten wurden verschiedenste humane Zelllinien – vor allem HL60-Zellen sowie Zecken-Zelllinien – verwendet [112, 140, 148, 149]. Für eine Untersuchung hinsichtlich der Funktion neutrophiler Granulozyten sind diese Zelllinien jedoch nur eingeschränkt geeignet. Außerdem zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse der Transkriptionsanalysen zwischen infizierten primären neutrophilen Granulozyten und verschiedenen Zelllinien [130, 132, 134].

1.14 Neutrophile Granulozyten bei der Erregerkontrolle

Neutrophile Granulozyten sind Teil des angeborenen Immunsystems und besitzen eine Vielzahl antimikrobieller Effektormechanismen [150]. Demnach ist es von großem Interesse, ihre Funktion im Infektionsgeschehen zu analysieren [151]. Nachweislich ist *A. phagocytophilum* in vivo strikt von der Anwesenheit neutrophiler Granulozyten abhängig, da deren Depletion zu einer signifikant niedrigeren Erregerlast führt [152]. Andererseits repliziert das Bakterium in einer prominenten Zelle des angeborenen Immunsystems. Es ist zurzeit noch unklar, ob und in welchem Ausmaß neutrophile Granulozyten selbst an der immunologischen Kontrolle von *A. phagocytophilum* beteiligt sind.

Insbesondere die Beteiligung des respiratorischen Bursts neutrophiler Granulozyten an der Kontrolle von *A. phagocytophilum* ist von einer Reihe unterschiedlicher Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert worden. Der Enzymkomplex der Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat(NADPH)-Oxidase ermöglicht die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Das aktive Enzym setzt sich aus dem membrangebundenen Cytochrom b558, das aus den

beiden Untereinheiten gp91^{phox} und p22^{phox} gebildet wird, und den zytosolischen Untereinheiten p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} sowie Rac2 und Rap1A zusammen [153]. In ruhenden Granulozyten befinden sich die einzelnen Komponenten ungeordnet in der Membran verschiedener sekretorischer Vesikel und Granula sowie als zytosolische Komplexe. Nach entsprechender Aktivierung erfolgt die Fusion der einzelnen Komponenten mit dem membrangebundenen Cytochrom b558 [154].

Es wurde zwar berichtet, dass *A. phagocytophilum* den respiratorischen Burst aktiv unterdrücke [155-158]; dies wurde jedoch von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt [159]. Vielmehr hat sich gezeigt, dass der Erreger in der Lage ist, ROS zu entgiften [158, 159]. Analysen bezüglich der transkriptionellen Regulation einzelner Komponenten des Enzyms zeigten ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. Einige Arbeitsgruppen beschrieben eine Herunterregulation, wobei teilweise nicht-quantitative PCR-Methoden genutzt wurden [155, 160-163]. Demgegenüber konnten Microarray-Analysen humaner neutrophiler Granulozyten keine Regulation bzw. eine Induktion verschiedener Komponenten der NADPH-Oxidase nachweisen [134].

Neben ROS sind Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) ebenfalls an der Kontrolle von Infektionskrankheiten beteiligt [164]. Diese werden durch neuronale, endotheliale und induzierbare Stickstoffmonoxidsynthasen (iNOS) generiert. Neben vielen anderen Zellen des Immunsystems besitzen neutrophile Granulozyten ebenfalls eine iNOS [164]. Diese wird in Phagozyten sowohl durch eine Reihe von Zytokinen als auch durch bakterielle Bestandteile wie z.B. LPS aktiviert [165, 166].

Wie die NADPH-Oxidase und die iNOS ist die Myeloperoxidase (MPO) ebenfalls an der Bildung von ROS und RNS in neutrophilen Granulozyten beteiligt [167]. Dieses Enzym wird in neutrophilen Granula gespeichert und bei Bedarf freigesetzt. Innerhalb des Phagosoms katalysiert die MPO die Oxidation von Chloriden und Wasserstoffperoxid – ein Folgeprodukt der Superoxide, die durch die NADPH-Oxidase gebildet werden – zu HOCl (hypochloriger Säure), welche eine effektive antimikrobielle Eigenschaft besitzt [168, 169]. Die über die iNOS produzierten Nitrite können ebenfalls durch die MPO zu Nitrylchloriden und NO umgewandelt werden [170].

Im Mausmodell hat sich jedoch gezeigt, dass in vivo trotz des Fehlens von phagozytärer NADPH-Oxidase, iNOS und MPO eine effektive Kontrolle von *A. phagocytophilum* möglich ist [107, 152]. Auch wurden gp91^{phox} und iNOS in ex vivo gewonnenen Lungen und Milzen infizierter Mäuse nicht transkriptionell reguliert [152]. Allerdings konnten durch die Behandlung mit dem iNOS-Inhibitor L-NAME (N-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester-Hydrochlorid)

die histologischen Veränderungen in der Leber *A. phagocytophilum* infizierter Mäuse reduziert werden [171].

Neutrophile Granulozyten besitzen neben einem Arsenal an antimikrobiellen Effektormechanismen auch die Fähigkeit, eine Reihe von Zytokinen bzw. Chemokinen zu produzieren [151, 172]. Ob neutrophile Granulozyten in vivo die während einer Infektion mit *A. phagocytophilum* freigesetzten Zytokine bzw. Chemokine selbst produzieren oder ob diese von anderen Zelltypen stammen, ist bislang nicht vollständig geklärt [53]. Nach Stimulation von HL60-Zellen mit *A. phagocytophilum* wurden in vitro im Überstand „monocyte chemotactic protein-1“ (MCP-1), „macrophage inflammatory protein-1 α “ (MIP-1 α), MIP-1 β , „regulated on activation, normal T cell expressed and secreted“ (RANTES) und Interleukin(IL)-8 gemessen [173, 174], während IL-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF) nicht nachweisbar waren [174]. Im Gegensatz dazu produzierten humane Leukozyten IL-1 β , IL-6, TNF und IL-8 [173, 175]. An HGA erkrankte Patienten zeigten erhöhte Konzentrationen von Interferon- γ (IFN- γ) und IL-10 im Serum. Die Konzentration von TNF, IL-1 β und IL-4 waren hingegen unverändert [176]. Im Serum bzw. Plasma *A. phagocytophilum*-infizierter Mäuse wurden IL-1 β , TNF, IFN- γ , IL-12/23, und IL-18 nachgewiesen [177-181]. Frühere Untersuchungen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Freiburg im Breisgau ergaben im Plasma infizierter Mäuse ebenfalls erhöhte Konzentrationen von TNF, IFN- γ sowie MCP-1, jedoch normale Mengen an IL-12p70 und IL-6 [152]. Die Bedeutung muriner neutrophiler Granulozyten als Produzenten von Zytokinen bzw. Chemokinen wurde bisher jedoch noch nicht näher analysiert.

1.15 Die angeborene und die erworbene Immunantwort

In der Frühphase einer Infektion mit *A. phagocytophilum*, in welcher die Abwehr vor allem auf Mechanismen der angeborenen Immunität beruht, ist von verschiedenen Autoren ein Einfluss von IFN- γ gefunden worden. Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Erregerlast in IFN- γ -defizienten Mäusen, obgleich die finale Erregerelimination nicht beeinflusst wurde [152, 180-182]. Die IFN- γ -Produktion durch Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), die durch Typ 1 Interferone und IL-12 angeregt werden, spielt vermutlich eine zentrale Rolle bei der initialen Kontrolle des Erregers noch vor der Einleitung der adaptiven Immunität [152, 177]. Im Mausmodell ist gezeigt worden, dass ein Zusammenhang zwischen der verstärkten IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen und teilweise auch durch NK-T-Zellen mit der während einer *A. phagocytophilum*-Infektion auftretenden entzündlichen Leberschädigung besteht [183]. Diese histopathologischen Veränderungen werden jedoch höchstwahrscheinlich nicht durch die Infektion selbst verursacht. Vielmehr spielen immunologische Prozesse eine wichtige Rolle,

da IFN- γ -defiziente Mäuse zwar eine deutlich verstärkte bakterielle Beladung aufgewiesen haben, doch typische Läsionen in der Leber ausgeblieben sind [184]. IL10^{-/-}-Mäuse hingegen zeigten deutlich schwerwiegendere Gewebeschädigungen der Leber, obschon deren Erregerlast und IFN- γ -Konzentration im Vergleich zu Kontrollmäusen unverändert blieben. Demnach scheint IL-10 als Gegenspieler von IFN- γ die Leber-Pathologie zu reduzieren, weitere anti-inflammatorische Mechanismen spielen jedoch wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle [184]. Eine kürzlich durchgeführte Studie hat eine IFN- γ -abhängige STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) vermittelte Aktivierung ex vivo gewonnener Splenozyten von infizierten Mäusen vermutet [185]. Zusammenfassend ist festzustellen, dass IFN- γ eine zentrale Rolle sowohl bei der initialen Erregerkontrolle als auch hinsichtlich der Leber-Pathologie spielt, jedoch keine finale Erregerelimination ermöglicht.

Ausgehend von den Befunden, dass infizierte SCID-Mäuse eine persistierende Infektion entwickeln [107, 142], ist die Bedeutung von T- und B-Zellen näher analysiert worden. Dabei hat sich gezeigt, dass B-Zellen für eine effektive Erregerkontrolle nicht notwendig sind, wohingegen T-Zell-defiziente Nacktmäuse nicht in der Lage sind, *A. phagocytophilum* effektiv zu eliminieren. Im Gegensatz dazu waren CD4⁺-MHC(major histocompatibility complex)-II-restringierte T-Zellen für eine langfristige Kontrolle von *A. phagocytophilum* entscheidend [152]. Typische Th1-Zytokine wie MCP-1, TNF und IFN- γ wurden im Plasma infizierter Mäuse nachgewiesen, waren jedoch für die Erregerelimination nicht notwendig [107, 152]. Bei der Kontrolle anderer intrazellulärer Erreger spielen Perforin ebenso wie eine Fas/Fas-Liganden-Interaktion eine gewisse Rolle zur Induktion der Apoptose infizierter Zellen durch CD8⁺ T-Zellen [186, 187]. Das Fehlen dieser T-Zell-Effektormechanismen hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf den Infektionsverlauf, so dass der fehlende Einfluss von CD8⁺ T-Zellen bei der Kontrolle von *A. phagocytophilum* bestätigt ist [152]. Der von CD4⁺ T-Zellen zur Elimination von *A. phagocytophilum* eingesetzte Effektormechanismus ist dagegen bislang unklar geblieben.

Die T-Zell-Aktivierung im Rahmen einer *A. phagocytophilum*-Infektion ist sowohl von der Antigenpräsentation durch CD11c⁺ dendritischen Zellen als auch von dem beteiligten kostimulatorischen Molekül CD40 abhängig [152]. Über welche Rezeptoren der Pathogen-erkennung jedoch die Immunaktivierung durch *A. phagocytophilum* erfolgt, ist nach wie vor unklar. *A. phagocytophilum* fehlen die meisten Gene für die Synthesewege für LPS und Peptidoglykan [105], die wichtige Liganden für die Aktivierung von TLRs und „nucleotide-binding oligomerization domain“(NOD)-like-Rezeptoren darstellen [188, 189]. Dies erklärt, dass die Kontrolle von *A. phagocytophilum* in vivo von MyD88 (myeloid differentiation factor 88), dem Haupt-Adaptormolekül der TLRs, unabhängig ist [107, 179]. Demgegenüber wurde eine TLR2 abhängige NF- κ B Aktivierung in murinen Makrophagen durch *A. phagocytophilum*

nachgewiesen [190]. Andere Arbeitsgruppen wiederum beschrieben eine Aktivierung von NOD-like-Rezeptoren durch *A. phagocytophilum*, durch welche eine vermehrte Produktion von IFN- γ und IL-18 ausgelöst wurde [191].

Die Bedeutung der humoralen Immunität ist für eine mögliche Immunisierung und die damit verbundenen Therapie- und Präventionsmöglichkeiten von großem Interesse. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bei seropositiven Tieren der Infektionsverlauf nach Reinfektion verkürzt war und ein passiver Transfer von Immunsereen oder monoklonalen Antikörpern eine partielle Protektion ermöglichte [144, 192, 193]. B-Zellen waren jedoch für die Überwindung einer primären *A. phagocytophilum*-Infektion nicht notwendig [152].

2 Fragestellung und Zielsetzung

A. phagocytophilum repliziert in neutrophilen Granulozyten und ist zudem im Mausmodell in vivo auf deren Anwesenheit angewiesen [152]. Daher ist es von grundsätzlichem Interesse, die Funktion neutrophiler Granulozyten hinsichtlich des Infektionsgeschehens näher zu verstehen. Die Gewinnung muriner neutrophiler Granulozyten ex vivo ist jedoch – wie bereits dargelegt – mit Schwierigkeiten verbunden. Die Aufreinigung primärer muriner neutrophiler Granulozyten ermöglicht teilweise nur einen Reinheitsgrad von 80% bis 85% [146]. Zu berücksichtigen sind ferner sowohl deren sehr kurze Lebensdauer als auch die geringe Zellausbeute [146, 147].

Eine neue Methodik zur In-vitro-Generierung von murinen neutrophilen Granulozyten und von Zellen des mononukleären-phagozytären Systems ermöglicht es nun, die immunologische Kontrolle von *A. phagocytophilum* durch neutrophile Granulozyten in vitro zu analysieren [194]. Hierfür werden von Mäusen gewonnene Progenitoren mit dem *Hoxb8*-Onkogen retroviral transduziert. Dieses Onkogen ist östrogenabhängig aktiv und ermöglicht somit in Anwesenheit von Östrogen eine ungehinderte Expansion der Vorläuferzellen. Ein Östrogenentzug inaktiviert *Hoxb8*, und die gleichzeitige Verwendung von entsprechenden Wachstumsfaktoren wie Stammzellularfaktor (SCF) oder Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) ermöglicht eine Ausdifferenzierung zu neutrophilen Granulozyten bzw. Makrophagen. Die funktionelle Ähnlichkeit dieser so gewonnenen Zellen mit primären Zellen wurde bereits gezeigt [194, 195]. Ein weiterer Vorteil dieser Methodik besteht darin, dass unterschiedliche Gen-defiziente Mausstämme genutzt werden können, um entsprechende Vorläuferzelllinien zu generieren [196]. Auf Grundlage dieser Methodik ist es nun möglich, die nachfolgenden Fragestellungen näher zu analysieren.

Obwohl *A. phagocytophilum* in vivo strikt von der Anwesenheit neutrophiler Granulozyten abhängig ist [152], hat sich gezeigt, dass ein Fehlen von antimikrobiellen Effektormechanismen neutrophiler Granulozyten den Infektionsverlauf in vivo nicht wesentlich beeinflusst [107, 152]. Aufgrund der Redundanz des Immunsystems ist zu fragen, inwieweit neutrophile Granulozyten an einer direkten Abwehrreaktion gegen *A. phagocytophilum* beteiligt sind und ob der Erreger Strategien entwickelt hat, um den spezifischen Abwehrmechanismen neutrophiler Granulozyten zu entkommen. Dazu wurden in dieser Arbeit entsprechende Gen-defiziente murine neutrophile Granulozyten mit *A. phagocytophilum* in vitro infiziert und der Infektionsverlauf verfolgt.

Da in vitro neben neutrophilen Granulozyten weitere Zelllinien infiziert werden können [118-120], ist hier außerdem zu untersuchen, inwieweit ausdifferenzierte murine Makrophagen die Replikation von *A. phagocytophilum* unterstützen.

Bislang ist der zugrundeliegende Mechanismus des vorübergehenden protektiven Effektes von Interferon- γ (IFN- γ) in der initialen Phase einer *A. phagocytophilum*-Infektion in vivo nicht vollständig erklärbar. Daher wird abschließend analysiert, inwieweit IFN- γ eine direkte Wirkung auf *A. phagocytophilum*-infizierte murine neutrophile Granulozyten hat.

3 Material und Methoden

3.1 Mäuse

Zur Gewinnung von Wildtyp bzw. gendefizienten *Hoxb8*-neutrophilen Granulozyten und *Hoxb8*-Makrophagen sind für diese Studie 8 bis 12 Wochen alte weibliche Mäuse verwendet worden. Die Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen im Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg im Breisgau gehalten.

C57BL/6 Wildtyp	Charles River, Sulzfeld
C57BL/6 gp91 ^{phox-/-}	Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA
C57BL/6 IFN- γ R ^{-/-}	Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA
C57BL/6 iNOS ^{-/-}	Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA
C57BL/6 MPO ^{-/-}	Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA

3.2 Bakterienstamm und Zelllinien

<i>A phagocytophilum</i> Webster	S. Dumler, The Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, USA
GP2-293 Zellen	Clontech, CA, USA
HL60-Zellen	ATCC, Manassas, VA, USA
CHO-Zellen, transfiziert mit murinem Stammzellfaktor(SCF)-Gen	Susanne Kirschnek, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität Freiburg im Breisgau
B16-Zellen, transduziert mit murinem Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF)-Gen	Susanne Kirschnek, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität Freiburg im Breisgau

3.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Ammoniumchlorid	Life Technologies, Darmstadt
β -Estradiol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol 50 mM	Life Technologies, Darmstadt
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Cytometric Bead Array (CBA) Flex Sets	BD Biosciences, Heidelberg
Diff-Quick	Dade Behring, Marburg
Dimethylsulfoxid	Sigma, Taufkirchen
DMEM, High glucose + GlutaMAX + Pyruvat	Life Technologies, Darmstadt

Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ficoll-Plaque PLUS	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg im Breisgau
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipopolysaccharid (LPS), <i>Escherichia coli</i> K12, D31m4 (Re)	List Biologicals, Campbell, CA, USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	Life Technologies, Darmstadt
MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate	Life Technologies, Darmstadt
murines Interferon- γ (IFN- γ)	PeproTech, Rocky Hill, NY, USA
murines Interleukin(IL)-3	PeproTech, Rocky Hill, NY, USA
murines IL-6	PeproTech, Rocky Hill, NY, USA
Naphtylethylendiamindihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Opti-MEM + GlutaMAX	Life Technologies, Darmstadt
PCR Mycoplasmen-Testkit I	AppliChem, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin (100 x)	Life Technologies, Darmstadt
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (endotoxinfrei)	Life Technologies, Darmstadt
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Retro-X Universal Packaging System	Clontech, Mountain View, CA, USA
RNAlater	Life Technologies, Darmstadt
RPMI 1640	Life Technologies, Darmstadt
StemPro Accutase	Life Technologies, Darmstadt
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Taq</i> Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TaqMan Gene Expression Assay mgp91 ^{phox}	Life Technologies, Darmstadt
TaqMan Gene Expression Assay mHPRT	Life Technologies, Darmstadt
TaqMan Gene Expression Assay miNOS	Life Technologies, Darmstadt
TaqMan Gene Expression Assay mMPO	Life Technologies, Darmstadt
TaqMan Gene Expression Master Mix	Life Technologies, Darmstadt
TRizol Reagent	Life Technologies, Darmstadt
Trypanblau	Life Technologies, Darmstadt
TURBO DNase	Life Technologies, Darmstadt
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin
Xfect	Clontech, Mountain View, CA, USA

3.4 Primer und Sonden

Die Primer und Sonden wurden von Metabion, Martinsried, synthetisiert und anschließend HPLC gereinigt:

16S RT Sonde (Fam-ACG CTG GCG GCA AGC TTA ACA CAT-BHQ1)
 16S RTf2 (GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG AA)
 16S RTf (GCT ATA AAG AAT AAT CCG TTC GAC TTG)
 oIMR0013 (CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC)
 oIMR0014 (AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC)
 oIMR297 (CAC GAG ACT AGT GAG ACG TG)
 oIMR0517 (AAG AGA AAC TCC TCT GCT GTG AA)
 oIMR0518 (CGC ACT GGA ACC CCT GAG AAA GG)
 oIMR0519 (GTT CTA ATT CCA TCA GAA GCT TAT CG)
 oIMR0587 (CCC ATT TAG ATC CTA CAT ACG AAA CAT ACG G)
 oIMR0588 (TTT CTG TCA TCA TGG AAA GGA GGG ATA CAG)
 oIMR1216 (ACA TGC AGA ATG AGT ACC GG)
 oIMR1217 (TCA ACA TCT CCT GGT GGA AC)
 oIMR1218 (AAT ATG CGA AGT GGA CCT CG)
 oIMR6515 (AGG TCT CTA ACG CCA TCG TG)
 oIMR6516 (GTT GAG GCC AGT GAA GAA GG)

3.5 Geräte

ABI Prism 79100HT Sequence Detection System	Life Technologies, Darmstadt
BD LSRFortessa	BD Biosciences, Heidelberg
Cytospin3	Shandon, Frankfurt am Main
ELISA Reader Spectramax 340 PC384	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
GeneAmp PCR System 9700	Life Technologies, Darmstadt

3.6 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

B16-Zellen transduziert mit murinem GM-CSF-Gen	RPMI 1640 FCS 10% β -Mercaptoethanol 30 μ M
CHO-Zellen transfiziert mit murinem SCF-Gen	Opti-MEM + GlutaMAX FCS 10% β -Mercaptoethanol 30 μ M
Einfriermedium	jeweilige Zellkulturmedium FCS 30% Dimethylsulfoxid 10%
GP2-293-Zellen	DMEM, High glucose + GlutaMAX + Pyruvat FCS 10% Penicillin-Streptomycin 1 x
HL60-Zellen mit <i>A. phagocytophilum</i> Webster infiziert	RPMI 1640 FCS 5%
HL60-Zellen uninfiziert	RPMI 1640 FCS 10%
<i>Hoxb8</i> -Granulozyten-Vorläufer	Opti-MEM + GlutaMAX FCS 10% β -Mercaptoethanol 30 μ M SCF-Überstand 1% β -Estradiol 1 μ M
<i>Hoxb8</i> -Granulozyten	Opti-MEM + GlutaMAX FCS 10% β -Mercaptoethanol 30 μ M SCF-Überstand 1%
<i>Hoxb8</i> -Makrophagen-Vorläufer	RPMI 1640 FCS 10% β -Mercaptoethanol 30 μ M GM-CSF-Überstand 1% β -Estradiol 1 μ M
<i>Hoxb8</i> -Makrophagen	RPMI 1640 FCS 10% β -Mercaptoethanol 30 μ M GM-CSF-Überstand 1%

Progenitoren	Opti-MEM + GlutaMAX FCS 10% β -Mercaptoethanol 30 μ M Penicillin-Streptomycin 1 x SCF-Überstand 1% murines IL-3 10 ng/ml murines IL-6 20 ng/ml
--------------	--

3.7 Gewinnung des SCF-und GM-CSF-Überstandes

Hierfür wurden CHO-Zellen, transfiziert mit dem murinen SCF-Gen, bzw. B16-Zellen, transfiziert mit dem murinen GM-CSF-Gen, im entsprechenden Kulturmedium in einer 162 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Ab einer Konfluenz der Zellen von 70% wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Der gewonnene Überstand wurde jeweils am selben Tag bei Raumtemperatur (RT) bei 3000 rpm 5 min zentrifugiert und bei -20 °C gelagert. Dies wurde täglich wiederholt, bis die Apoptose der Zellen eintrat. Zuletzt wurde der gesamte gewonnene Überstand steril filtriert, in entsprechenden Gefäßen aliquotiert und wiederum bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.8 Bestimmung der Infektionsrate und der Zellzahl

Für die Zellzählung wurde entsprechend der Zelldichte eine Verdünnung der Zellen von 1:2 oder 1:10 in Trypanblau (1:5 in PBS vorverdünnt) angefertigt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für den mikroskopischen Nachweis der Infektionsrate wurde 400 μ l Zellsuspension in einer pin3-Zentrifuge 5 min bei 700 rpm zentrifugiert. Die Objektträger wurden mit Diff-Quick gefärbt und unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung beurteilt. Die Infektionsrate wurde durch Auszählen eines Gesichtsfeldes bestimmt.

3.9 Produktion des Virusüberstands

1 x 10⁶ GP2-293 Zellen wurden in 1 ml DMEM Medium + 10% FCS in einer 6-well-Platte ausgesät. 5 μ g des Plasmids 3HA-ERHBH-*Hoxb8*-neo (Susanne Kirschnek, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Freiburg im Breisgau) sowie 5 μ g des Plasmids pVSV-G (Clontech, Mountain View, CA, USA) wurden mit Xfect Reaktionspuffer

derart gemischt, dass sich ein Gesamt-Volumen von 100 µl ergab. In einem zweiten Ansatz wurden 1,5 µl Xfect Polymer mit 98,5 µl Xfect Reaktionspuffer versetzt. Beide Röhrchen wurden gründlich durchmischt. Danach wurde die Polymer-Lösung zu der Plasmid-Lösung gegeben. Die Mischung wurde für 10 s gevortext, für 10 min bei RT inkubiert und dann tropfenweise zu den GP2-293 Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei 5% CO₂ und 37 °C für 10 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch 3 ml frisches Medium ersetzt. Nach 48 h und 72 h wurde der Virusüberstand geerntet, aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.10 Gewinnung von Progenitoren und retrovirale Transduktion

Für die Gewinnung muriner Progenitoren wurden 8 bis 12 Wochen alte weibliche Mäuse verwendet. Nach steriler Präparation von Tibia und Femur wurde das Knochenmark unter Verwendung einer 27-G-Kanüle mit RPMI 1640 + 10% FCS + 1 x Penicillin-Streptomycin ausgespült, aufgefangen, bei 1500 rpm 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Pellet in 3 ml 0,17 M Ammoniumchlorid resuspendiert und 3 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde das Pellet mit 10 ml PBS + 1% FCS neutralisiert und erneut bei RT bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 4 ml PBS + 1% FCS resuspendiert. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde die Zellsuspension vorsichtig auf 3 ml Ficoll-Plaque PLUS geschichtet, so dass sich die Schichten nicht durchmischten, und nachfolgend bei RT bei 1800 rpm 30 min zentrifugiert. Danach wurde die obere Schicht bis auf ca. 0,5 ml des Pellets abgenommen. Dieses wurde mit 45 ml PBS + 1 % FCS aufgefüllt und bei RT bei 2000 rpm 10 min zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde wiederum mit PBS + 1% FCS resuspendiert und bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in das Progenitoren-Medium aufgenommen und je nach Zelldichte in ein bis zwei wells einer 6-well-Platte (ca. 3 ml Medium/well) ausgesät und für 2 bis 4 Tage inkubiert. Nach Bedarf wurde in den nachfolgenden Tagen erneut das Medium hinzugefügt.

Für die retrovirale Transduktion zur Gewinnung von Granulozyten-Vorläufern wurden jeweils 2×10^5 der gewonnenen Progenitoren bei 1500 rpm 5 min abzentrifugiert und mit 1 ml Virusüberstand, 10 µl SCF-Überstand, 1 µl β-Estradiol (1 mM Stock) aufgenommen. Für die Kontrollansätze wurde entsprechend 1 ml Vorläufermedium verwendet. Für die Transduktion zur Gewinnung von Makrophagen wurde anstelle des SCF-Überstandes GM-CSF-Überstand verwendet. Diese Ansätze wurden jeweils in 12-well-Platten bei 1800 rpm und 25 °C 1 h 30 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde 1 ml Vorläufermedium hinzugegeben. Nachfolgend wurden die Zellen je nach Dichte alle 2 bis 3 Tage passagiert. Nach insgesamt

4 Wochen wurde die Selektion beendet. Die Zellen wurden direkt verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.11 DNA-Präparation aus Vorläufer-Zelllinien

Zur Präparation von DNA aus den Vorläufer-Zelllinien wurde der „QIAamp DNA Mini Kit“ nach Angaben des Herstellers zur Präparation von DNA aus Zellen verwendet. Es wurden 5×10^6 Zellen in der Präparation eingesetzt. Die Elution erfolgte in 100 μ l Elutionspuffer.

3.12 Genotypisierung der Zelllinien

gp91^{phox-/-}-Genotypisierung:

	Stock-Konzentration	End-Konzentration	Volumen für eine Probe
Puffer	10 x	1 x	5,0 μ l
MgCl ₂	50 mM	2,50 mM	2,5 μ l
dNTP	2 mM	0,20 mM	5,0 μ l
oIMR0517	20 μ M	1,00 μ M	2,5 μ l
oIMR0518	20 μ M	1,00 μ M	2,5 μ l
oIMR0519	20 μ M	1,00 μ M	2,5 μ l
Taq Polymerase	5 U/ μ l	0,02 U/ μ l	0,2 μ l
DNA			2,0 μ l
H ₂ O			27,8 μ l
Gesamtvolumen			50,0 μ l

Mutante = 195 Basenpaare (bp)

Heterozygot = 195 bp und 240 bp

Wildtyp = 240 bp

Polymerase-Ketten-Reaktion(PCR)-Programm:

Denaturierung: 94 °C 3 min

Amplifikation: 12 x 94 °C 20 s, 64 °C 30 s, 72 °C 35 s (je Zyklus -0,5 °C)

Amplifikation: 25 x 94 °C 20 s, 58 °C 30 s, 72 °C 35 s

Interferon- γ Rezeptor(IFN- γ R)^{-/-}-Genotypisierung:

	Stock- Konzentration	End- Konzentration	Volumen für eine Probe
Puffer	10 x	1 x	4,0 μ l
MgCl ₂	50 mM	2,00 mM	1,6 μ l
dNTP	2 mM	0,25 mM	5,0 μ l
oIMR0013	20 μ M	0,50 μ M	1,0 μ l
oIMR0014	20 μ M	0,50 μ M	1,0 μ l
oIMR0587	20 μ M	0,50 μ M	1,0 μ l
oIMR0588	20 μ M	0,50 μ M	1,0 μ l
<i>Taq</i> Polymerase	5 U/ μ l	0,02 U/ μ l	0,2 μ l
DNA			1,0 μ l
H ₂ O			24,2 μ l
Gesamtvolumen			40,0 μ l

Mutante = 280 bp

Heterozygot = 280 bp + 189 bp

Wildtyp = 189 bp

PCR-Programm:

Denaturierung: 94 °C 3 min

Amplifikation: 12 x 94 °C 20 s, 64 °C 30 s, 72 °C 35 s

Amplifikation: 25 x 94 °C 20 s, 58 °C 30 s, 72 °C 35 s

Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase(iNOS)^{-/-}-Genotypisierung:

	Stock- Konzentration	End- Konzentration	Volumen für eine Probe
Puffer	10 x	1 x	5,00 µl
MgCl ₂	50 mM	2,00 mM	2,00 µl
dNTP	2 mM	0,20 mM	5,00 µl
oIMR1216	20 µM	1,33 µM	3,30 µl
oIMR1217	20 µM	0,08 µM	0,20 µl
oIMR1218	20 µM	2,50 µM	6,25 µl
<i>Taq</i> Polymerase	5 U/µl	0,02 U/ml	0,20 µl
DNA			2,00 µl
H ₂ O			26,05 µl
Gesamtvolumen			50,00 µl

Mutante = 275 bp

Heterozygot = 275 bp und 108 bp

Wildtyp = 108 bp

PCR-Programm:

Denaturierung: 94 °C 3 min

Amplifikation: 40 x 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s

Myeloperoxidase(MPO)^{-/-}-Genotypisierung:

	Stock- Konzentration	End- Konzentration	Volumen für eine Probe
Puffer	10 x	1 x	5,0 µl
MgCl ₂	50 mM	2,00 mM	2,0 µl
dNTP	2 mM	0,20 mM	5,0 µl
oIMR6515	20 µM	1,00 µM	2,5 µl
oIMR6516	20 µM	1,00 µM	2,5 µl
oIMR297	20 µM	1,00 µM	2,5 µl
<i>Taq</i> Polymerase	5 U/µl	0,02 U/µl	0,2 µl
DNA			2,0 µl
H ₂ O			28,3 µl
Gesamtvolumen			50,0 µl

Mutante = 350 bp

Heterozygot = 350 bp und 155 bp

Wildtyp = 155 bp

PCR-Programm:

Denaturierung: 94 °C 3 min

Amplifikation: 40 x 94 °C 30 s, 68 °C 1 min, 72 °C 1 min

3.13 Zellkultur

Hoxb8-Granulozyten-Vorläufer- und *Hoxb8*-Makrophagen-Vorläufer-Zellen wurden in 6-well-Platten mit 3 bis 6 ml des entsprechenden Vorläufermediums bei 5% CO₂ und 37° C kultiviert. Je nach Zelldichte wurden alle 2 bis 3 Tage entsprechende Aliquots (100 µl – 1 ml) passagiert.

Zur Differenzierung von *Hoxb8*-Granulozyten-Vorläufer- und *Hoxb8*-Makrophagen-Vorläufer-Zellen zu *Hoxb8*-Granulozyten bzw. *Hoxb8*-Makrophagen wurden die Zellen bei RT bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert und anschließend zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in dem entsprechenden *Hoxb8*-Granulozyten- bzw. *Hoxb8*-Makrophagen-Medium aufgenommen. Zur Ausdifferenzierung wurden 3×10^5 Granulozyten bzw. $4,5 \times 10^5$ Makrophagen pro well in 3 ml Medium in einer 6-well-Platte ausgesät. Aus praktischen Gründen wurden in späteren Versuchen $1,5 \times 10^6$ Makrophagen pro Zellkulturschale in 10 ml Medium verwendet. Die Differenzierungsdauer betrug bei Granulozyten 4 Tage und bei Makrophagen 6 Tage. Für die Versuche wurden jeweils $1,2 \times 10^7$ differenzierte *Hoxb8*-Granulozyten bzw. $1,2 \times 10^7$ *Hoxb8*-Makrophagen in 6 ml Differenzierungsmedium pro well einer 6-well-Platte eingesetzt.

Da die Makrophagen adhärent wuchsen, mussten sie vor der Verwendung zunächst mit 3 ml PBS/well bzw. 10 ml PBS/Zellkulturschale gewaschen werden, um sie nachfolgend mit 0,5 ml StemPro Accutase/well bzw. 3 ml StemPro Accutase/Zellkulturschale bei 37 °C und 5% CO₂ für 10 min zu inkubieren. Nachfolgend konnten die dadurch abgelösten Makrophagen weiter verwendet werden.

HL60-Zellen wurden in RPMI 1640 + 10% FCS kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage passagiert, indem die Zellzahl auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt wurde.

Zur Kryokonservierung wurden 5×10^6 Zellen/ml pro Einfrierröhrchen eingesetzt. Die Zellen wurden bei RT bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Einfriermedium tropfenweise auf das Pellet gegeben. Nach Lagerung in einer Isopropanol-Box bei -80 °C über Nacht wurden die Einfrierröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Nachfolgend wurde unverzüglich tropfenweise das entsprechende Zellkulturmedium zugegeben. Nach Zentrifugation bei RT bei 1000 rpm für 5 min wurden die Zellen im entsprechenden Medium aufgenommen und je nach Zelllinie in 6-well-Platten oder Zellkulturflaschen ausgesät.

Die Zellkulturen wurden mittels PCR-Mycoplasmen-Testkit I auf *Mykoplasma spp.* getestet.

3.14 Anzucht von *A. phagocytophilum*

Für die Anzucht von *A. phagocytophilum* in HL60-Zellen wurden mindestens 10 ml 2×10^5 /ml uninfizierte HL60-Zellen vorbereitet. Infizierte eingefrorene HL60-Zellen wurden aufgetaut, das Pellet in 5 ml RPMI + 10% FCS aufgenommen und den uninfizierten Zellen hinzugefügt. Nach 2 Tagen wurden die Zellen gezählt, ein Zytospin aus 400 μ l Zellsuspension angefertigt und mit Diff-Quick gefärbt. Die Infektionsrate wurde mikroskopisch durch Auszählen eines Gesichtsfeldes bestimmt. Wenn sie zwischen 70% bis 90% lag, wurden uninfizierte HL60-Zellen hinzugegeben. Das gewählte Verhältnis zwischen infizierten und uninfizierten HL60-Zellen war von der gewünschten Infektionsrate nach 2 Tagen bzw. von der Infektionsrate der verwendeten Zellen abhängig. Wurde eine Infektionsrate von 90% nach 2 Tagen benötigt, wurden die infizierten Zellen mit uninfizierten HL60-Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt, so dass sich eine Konzentration von 2×10^5 ml ergab. Je geringer die Infektionsrate der verwendeten HL60-Zellen war, desto weniger uninfizierte HL60-Zellen mussten hinzugefügt werden. Die Endkonzentration aus infizierten und uninfizierten HL60-Zellen sollte jedoch immer 2×10^5 /ml betragen.

Um *A. phagocytophilum* in *Hoxb8*-Granulozyten anzüchten zu können, mussten diese zunächst wie oben beschrieben aus den Vorläufern differenziert werden. Hierfür wurden infizierte Zellen aufgetaut, das Pellet in 1 ml *Hoxb8*-Granulozyten Medium aufgenommen und mit diesem ein well differenzierter *Hoxb8*-Granulozyten infiziert. Nach spätestens 4 Tagen mussten erneut *Hoxb8*-Granulozyten differenziert werden, da nach diesem Zeitraum meist alle Granulozyten infiziert und fast alle Zellen bereits apoptotisch waren. Das Volumen an infizierten Zellen, das genutzt wurde, um neue uninfizierte differenzierte *Hoxb8*-Granulozyten zu infizieren, war stark abhängig sowohl von der bestehenden Infektionsrate als auch von der gewünschten Infektionsrate an einem bestimmten Tag. Je höher die Infektionsrate war, desto weniger infizierte Zellen wurden benötigt, um neue uninfizierte *Hoxb8*-Granulozyten so zu infizieren, dass sie nach 3 bis 4 Tagen eine Infektionsrate von 90% erreichten. Zur Passage des Erregers wurden in der Regel 100 bis 200 μ l für ein well uninfizierter differenzierter *Hoxb8*-Granulozyten verwendet.

3.15 Versuchsaufbau

Für die Infektionsversuche wurden wirtszellfreie Präparationen von *A. phagocytophilum* hergestellt. Hierfür wurden 3×10^7 infizierte *Hoxb8*-Granulozyten bzw. 3×10^6 infizierte HL60-Zellen jeweils mit einer Infektionsrate von 90% verwendet. Dieses Verhältnis wurde in Vorversuchen ermittelt, um ein ähnliches Inokulum zum Zeitpunkt 0 zu erhalten. Nach dem

Abzentrifugieren der infizierten Zellen wurden das Pellet in 10 ml sterilem PBS aufgenommen und 10 x durch eine 27 G Kanüle gedrückt, um eine mechanische Zerstörung der Wirtszellen zu erreichen. Es wurde eine 10-minütige differentielle Zentrifugation bei RT bei 750 g durchgeführt, um den Zelldebris zu pelletieren. Der Überstand wurde gewonnen und bei RT bei 2300 g 10 min zentrifugiert. Das resuspendierte Pellet wurde in die Infektionsversuche eingesetzt.

Nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Infektions- bzw. Stimulationsdauer wurden jeweils 500 µl Zellen pro Ansatz abgenommen und bei RT bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert. Die dadurch gewonnenen Überstände wurden für spätere Zytokinmessungen bei -80 °C asserviert. Die Pellets wurden für die RNA-Isolierung in 500 µl RNAlater aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80 °C asserviert. Von allen Ansätzen mit *Hoxb8*-Granulozyten wurde nach 48 h bis 72 h ein Zytospin angefertigt, um die Infektionsrate orientierend mikroskopisch zu beurteilen. Bei den Ansätzen mit infizierten *Hoxb8*-Makrophagen wurden diese zusätzlich nach 96 h mit StemPro Accutase abgelöst und ein weiterer Zytospin angefertigt.

Je nach Fragestellung wurden die Zellen mit 10 ng/ml bzw. 200 ng/ml LPS oder mit 40 ng/ml IFN-γ stimuliert.

Bei einigen Versuchen wurde ein zusätzlicher Waschschrift nach 4 h Infektions- bzw. Stimulationsdauer durchgeführt. Hierfür wurden die jeweiligen Ansätze nach 4 h abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 5,5 ml des jeweiligen Mediums (neues Medium) aufgenommen.

3.16 RNA-Isolierung

Die in RNAlater asservierten Zellen wurden bei RT bei 8000 rpm 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das RNAlater abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml TRIzol aufgenommen, kurz gevortext, bei RT 5 min inkubiert und dann jeweils 200 µl Chloroform hinzugefügt. Anschließend wurde es 15 s gevortext, 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei 4 °C bei 12000 rpm 15 min zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde nach der Zentrifugation vorsichtig, aber vollständig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Sowohl Interphase als auch organische Phase wurden verworfen. Danach wurden 500 µl Isopropanol zur Ausfällung der RNA hinzugegeben. Es wurde bei 2000 U/min 5 s gevortext und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Es folgte ein 8-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 12000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml frisch angesetztem 75%igen Ethanol bei 4 °C und 10000 rpm für 5 min gewaschen. Der restliche

Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen. Die Proben wurden bei RT mit geöffnetem Deckel 5 min getrocknet und in 30 µl H₂O, 3 µl TURBO DNase Puffer und 1 µl TURBO DNase aufgenommen. Es wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die TURBO DNase wurde anschließend bei 75 °C für 10 min inaktiviert. Die so gewonnene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.17 Umschreiben von RNA in cDNA

Die präparierte RNA wurde mit Hilfe des kommerziellen „High Capacity cDNA reverse Transcription Kits“ in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Reaktionsansatz für eine Probe (20 µl):

10 x RT Puffer	2 µl
10 x RT Random Primer	2 µl
25 x dNTP Mix	0,8 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
Ultra Pure Water	4,2 µl
RNA	10 µl

PCR-Programm:

Schritt 1:	25 °C 10 min
Schritt 2:	37 °C 120 min
Schritt 3:	85 °C 5min
Schritt 4:	20 °C ∞

3.18 TaqMan Real-time PCR

Zur relativen Quantifizierung der Expression unterschiedlicher Gene wurden kommerzielle „TaqMan Real-Time PCRs“ verwendet. Zur Bestimmung der Erregerlast von *A. phagocytophilum* wurde ein eigener, auf der Expression der bakteriellen 16S rRNA basierender Assay eingesetzt. Die Proben wurden auf den mRNA-Gehalt der murinen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) normalisiert. Zur relativen Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta C_t$ (cycle threshold)-Methode angewendet. Sie hat den Vorteil, dass auf externe

Standards verzichtet werden kann. Stattdessen wird die Expression der Zielgene auf die Expression eines nicht regulierten, aber ubiquitär exprimierten Gens bezogen.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet: 50 °C 2 min, 40 Zyklen 95 °C 10 min, 95 °C 11 min, 60°C 1 min. Die Analyse der Daten wurde mittels der SDS 2.1 Software durchgeführt.

Reaktionsansatz für die Gen-spezifischen Assays (15 µl):

TaqMan Gene Expression Master Mix	7,5 µl
Gen-spezifischer Assay (20 x)	0,75 µl
cDNA	2 µl
Ultra Pure Water	4,75 µl

Reaktionsansatz für die Detektion von *A. phagocytophilum* (15 µl):

TaqMan Gene Expression Master Mix	7,5 µl
Sonde 16SRT	0,375 µl
Primer 16 SRTf2	0,675 µl
Primer 16 SRTTr	0,675 µl
cDNA	2 µl
Ultra Pure Water	3,775 µl

3.19 Zytokin- bzw. Chemokin-Analyse mittels Durchflusszytometrie

Unter Verwendung von „CBA Flex Sets“ wurde der Gehalt an IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12/IL-23, IL-17A, „keratinozyte-derived chemokine“ (KC), „macrophage inflammatory protein-1 α “ (MIP-1 α), „monokine induced by IFN- γ “ (MIG), „regulated on activation, normal T cell expressed and secreted“ (RANTES) und an Tumornekrosefaktor (TNF) in den Zellkultur-Überständen bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Auswertung der Daten wurde die „FCAP Array Software“ verwendet.

3.20 Nachweis von Nitrit im Zellkultur-Überstand

In den Zellkultur-Überständen wurde der Nitrit-Gehalt als Maß für die Aktivität der iNOS mittels Griess-Assay gemessen. Folgende Reagenzien wurden dafür eingesetzt, die lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert wurden:

Griess-Reagenz I:

1 g Sulfanilamid
5 ml H₃PO₄
ddH₂O ad 100 ml

Griess-Reagenz II:

0,1 g Naphtylethylendiamindihydrochlorid
ddH₂O ad 100 ml

Unmittelbar vor der Verwendung wurden die Griess-Reagenzien I und II im Verhältnis 1:1 gemischt. In einer 96-well-Platte wurden 100 µl dieser Lösung mit jeweils 100 µl Zellkultur-Überstand versetzt. Innerhalb von 30 min wurde die Absorption bei 550 nm photometrisch gemessen. Zur Quantifizierung wurde ein Natriumnitrit-Standard verwendet.

3.21 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Tests, die mit der „GraphPad Prism Software 6.05“ (2014) berechnet wurden. Sofern nicht anders angegeben, wurden dabei die infizierten bzw. stimulierten Ansätze mit der Medium-Kontrolle verglichen. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Es wurde nicht für multiples Testen korrigiert.

4 Ergebnisse

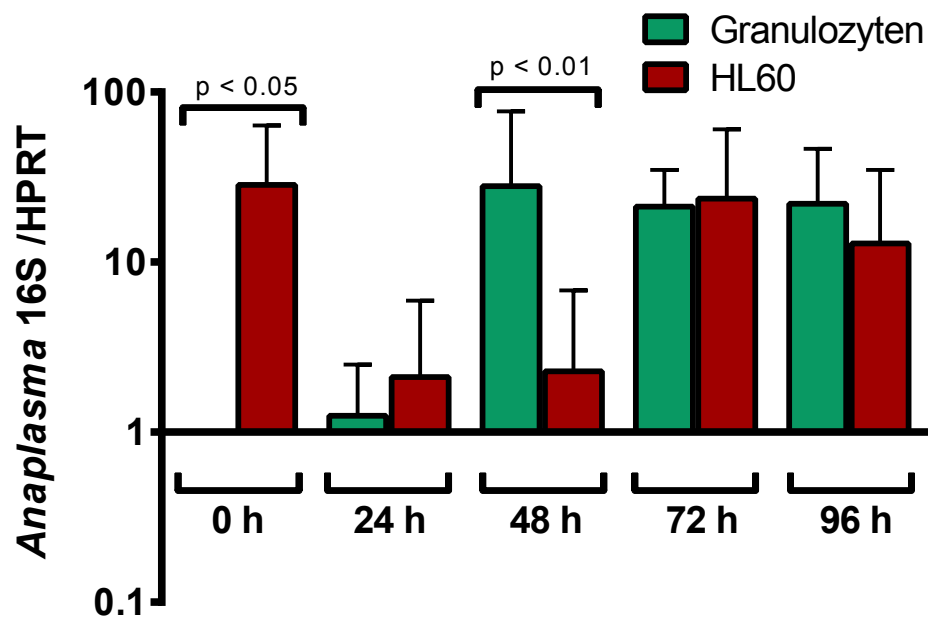
4.1 Wachstumsverlauf in murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten

Zunächst wurde in dieser Studie der Infektionsverlauf in murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten bzw. *Hoxb8*-Granulozyten untersucht. Dabei wurde verglichen, ob die Herkunft des Inokulums aus murinen *Hoxb8*-Granulozyten oder aus humanen HL60-Zellen einen Einfluss auf die Wachstumskinetik von *A. phagocytophilum* hat.

Bei Verwendung von Erregermaterial aus derselben Anzahl an *Hoxb8*-Granulozyten bzw. HL60-Zellen hatte sich hinsichtlich der Ausgangs-Infektionsdosis eine signifikante ($p < 0,05$) Diskrepanz gezeigt, die bei Normalisierung auf den Gehalt an *A. phagocytophilum* in *Hoxb8*-Granulozyten deutlich wurde (Abbildung 1 A). Die Ausgangs-Infektionsdosis war bei der Verwendung von Erregern aus HL60-Zellen etwa 10-fach höher gewesen. Dies täuschte bei Normalisierung auf den jeweiligen 0-h-Wert ein signifikant (24 h und 48 h = $p < 0,01$, 72 h = $p < 0,05$, 96 h = $p < 0,01$) schlechteres Wachstum von *A. phagocytophilum* vor, wenn der Erreger aus HL60-Zellen gewonnen wurde (Abbildung 1 B).

Nach erfolgreicher Standardisierung der Infektionsdosis wurde kein signifikanter Unterschied des Wachstumsverlaufes mehr beobachtet (Abbildung 2). Für die Standardisierung wurde eine 10-fach niedrigere Menge an HL60-Zellen als an *Hoxb8*-Granulozyten zur Präparation der Infektionsdosis verwendet.

A



B

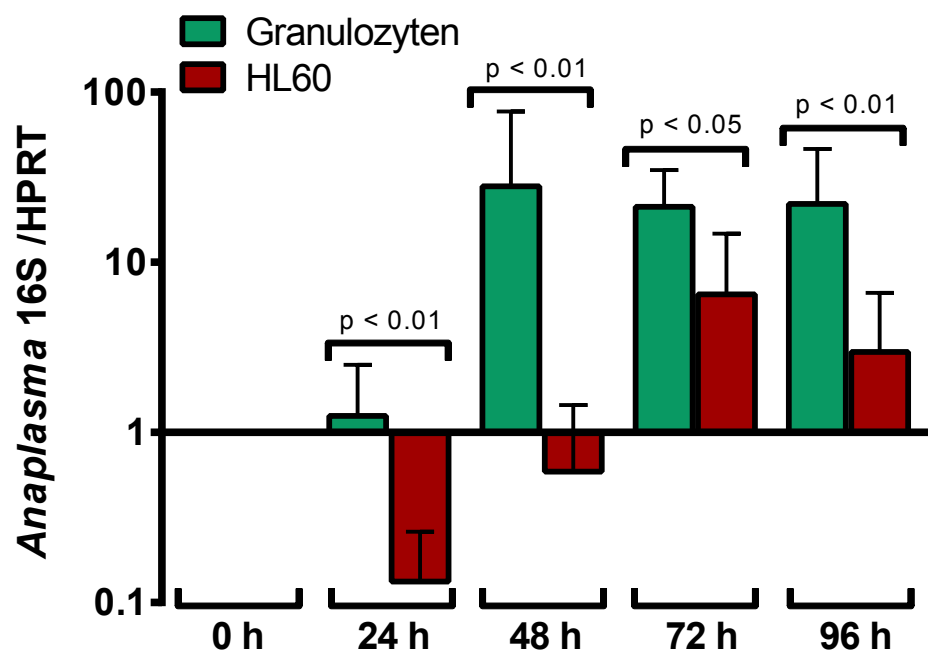


Abbildung 1. Relative Zunahme von *A. phagocytophilum*-spezifischer 16S rRNA, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von in vitro generierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten bzw. aus HL60-Zellen gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus sieben unabhängigen Experimenten. **(A)** Normalisierung auf den Gehalt an *A. phagocytophilum* in murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten; **(B)** Normalisierung auf den jeweiligen 0-h-Wert.

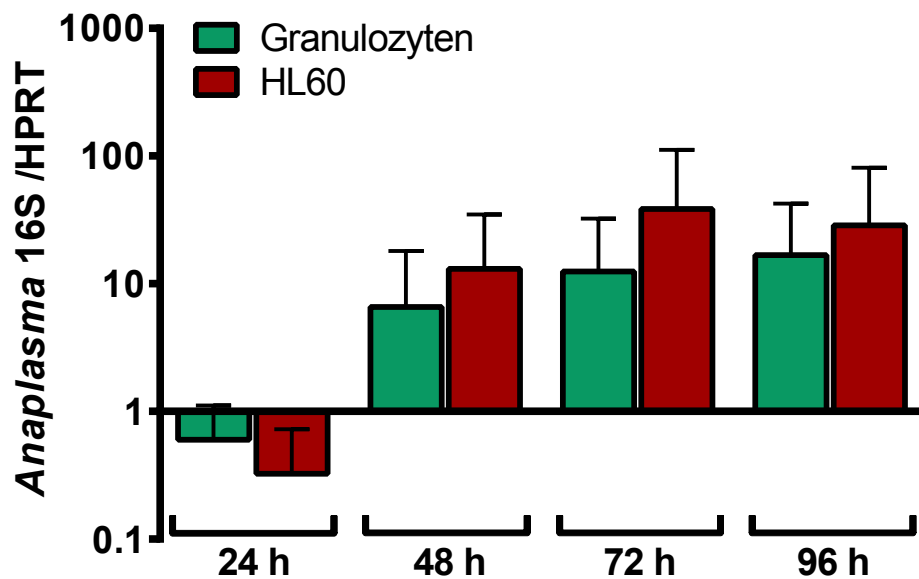


Abbildung 2. Relative Zunahme von *A. phagocytophilum*-spezifischer 16S rRNA, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von in vitro generierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten bzw. aus HL60-Zellen gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus sechs unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den jeweiligen 0-h-Wert.

4.2 Die Beeinflussung des Wachstumsverlaufes von *A. phagocytophilum* durch einen Waschschrift 4 h nach Infektion

In-vitro-Studien haben gezeigt, dass *A. phagocytophilum* etwa 4 h benötigt, um seine Wirtszelle zu invadieren [158]. Damit ausgeschlossen werden konnte, dass größere Mengen an extrazellulär verbleibenden Erregern den Infektionsverlauf beeinflussen, wurden die Zellen nach 4 h gewaschen, um dadurch bislang nicht-invasive Bakterien zu entfernen. Dabei zeigte sich nach 4 h eine stärkere Erregerabnahme in den gewaschenen Zellen als in ungewaschenen (Abbildung 3), obgleich unabhängig vom Waschschrift eine ähnliche Zunahme des Wachstums nach 48 h bis 96 h festzustellen war. Signifikante Unterschiede des Wachstums zwischen den einzelnen Ansätzen wurden nicht beobachtet. In den folgenden Versuchen wurde deshalb auf das Waschen nach 4 h verzichtet, und das Inokulum wurde nur noch aus infizierten *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen.

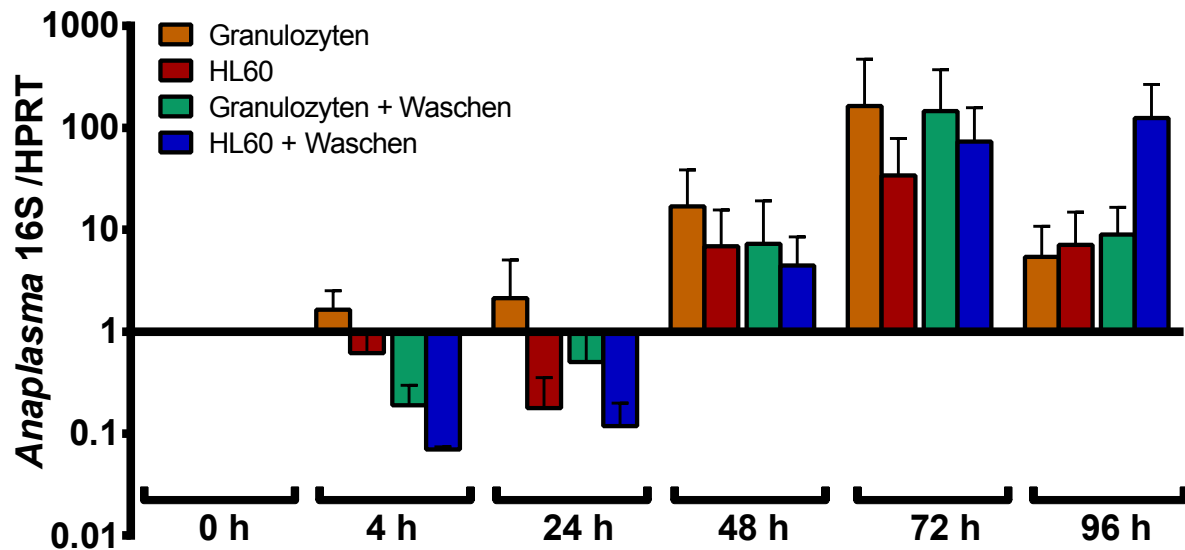


Abbildung 3. Relative Zunahme von *A. phagocytophilum*-spezifischer 16S rRNA, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von in vitro generierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten bzw. aus HL60-Zellen gewonnen. Die Hälfte der Ansätze wurde nach 4 h gewaschen, um bislang nicht-invasive Erreger zu entfernen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den jeweiligen 0-h-Wert.

4.3 Die Zytokinproduktion von murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten nach Infektion mit *A. phagocytophilum*

Inzwischen ist akzeptiert, dass neutrophile Granulozyten in der Lage sind, Zytokine und Chemokine zu produzieren [172]. Deshalb wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob die Infektion von *Hoxb8*-Granulozyten mit *A. phagocytophilum* zur Produktion ausgewählter Zytokine und Chemokine führe. Als Positivkontrolle wurde Lipopolysaccharid (LPS) eingesetzt. Zur Negativkontrolle dienten sowohl unstimulierte Ansätze als auch solche, die mit uninfizierten, lysierten *Hoxb8*-Granulozyten versetzt worden waren. In beiden Fällen wurde keine relevante Produktion von Zytokinen bzw. Chemokinen beobachtet.

Weder eine Infektion mit *A. phagocytophilum* noch eine Stimulation mit LPS führten zur Produktion von Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin(IL)-1 β , IL-12/IL-23, IL-17A, „keratinozyte-derived chemokine“ (KC) und „monokine induced by IFN- γ “ (MIG) durch *Hoxb8*-Granulozyten (Daten nicht gezeigt).

Verglichen mit den unstimulierten Ansätzen, ließ sich jedoch nach 48 h bis 96 h ein signifikanter ($p < 0,01$) Anstieg der Produktion von „regulated on activation, normal T cell expressed and secreted“ (RANTES) im Überstand der infizierten *Hoxb8*-Granulozyten feststellen; dieser Anstieg fiel allerdings im Vergleich zu den LPS-stimulierten Ansätzen gering aus (Abbildung 4 A).

Außerdem wurde für „macrophage inflammatory protein-1 α “ (MIP-1 α) – ähnlich wie für RANTES – nach 24 h bis 96 h ein signifikanter (24 h = $p < 0,05$, 48 h bis 96 h = $p < 0,01$) Anstieg der Produktion infolge der Infektion mit *A. phagocytophilum* beobachtet (Abbildung 4 B).

Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit *A. phagocytophilum* zu keiner relevanten IL-6 Produktion durch die *Hoxb8*-Granulozyten (Abbildung 5 A). Auch der Anstieg der IL-6 Produktion durch die LPS-Stimulation fiel, obgleich signifikant (24 h = $p < 0,01$, 48 h bis 96 h = $p < 0,05$) höher als in den unstimulierten Ansätzen, gering aus.

Die Infektion mit *A. phagocytophilum* löste in *Hoxb8*-Granulozyten einen signifikanten Anstieg der Produktion des Tumornekrosefaktors (TNF) nach 48 h ($p < 0,05$), 72 h ($p < 0,01$) und 96 h ($p < 0,05$) Infektionsdauer aus, der mit der durch LPS-Stimulation vergleichbar war (Abbildung 5 B).

Zusammenfassend zeigt dies, dass die Infektion von Granulozyten mit *A. phagocytophilum* zu einer Stimulation der Wirtszellen führt und dass der Erreger nicht in der Lage ist, diese vollständig zu unterdrücken.

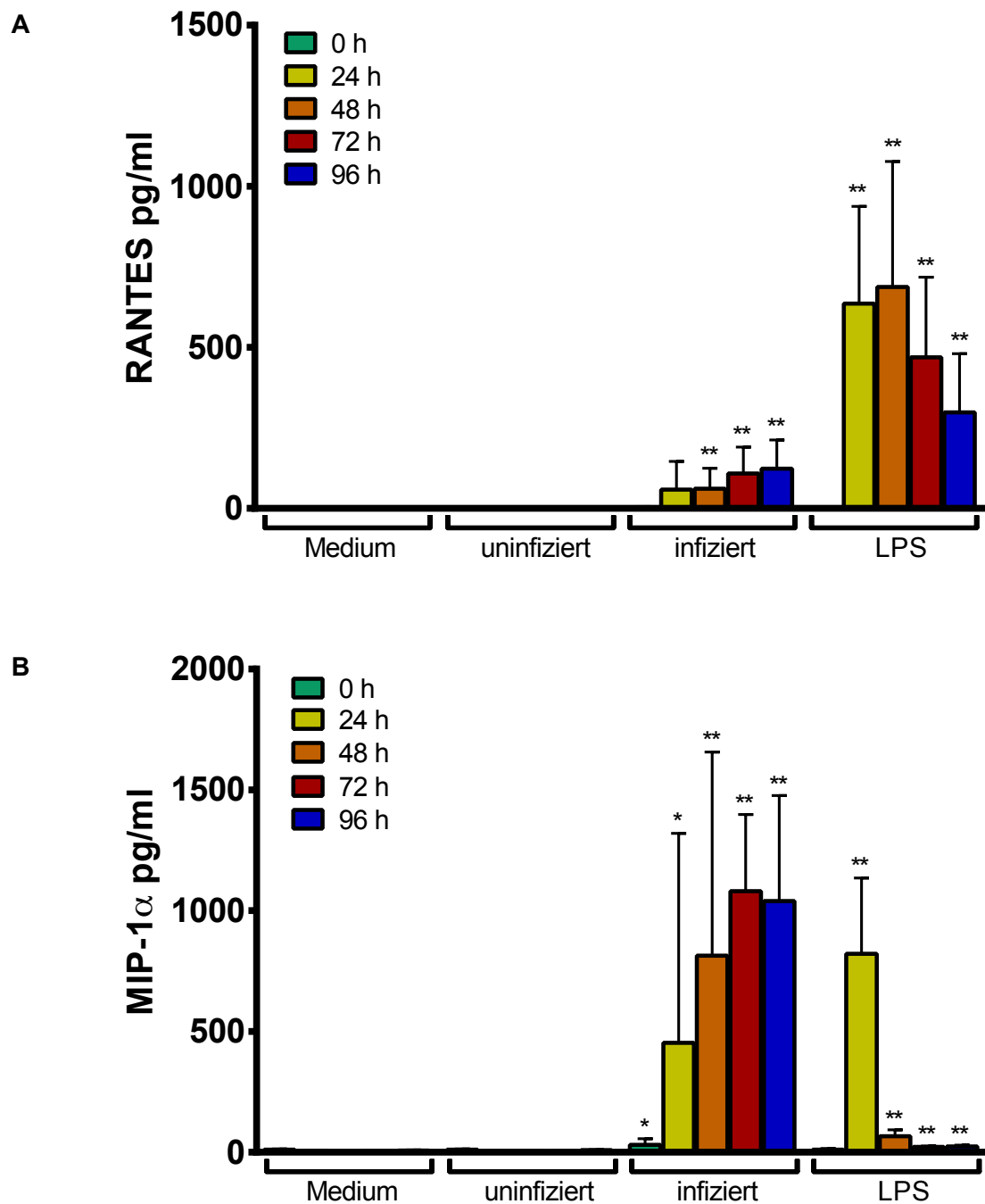


Abbildung 4. Zytokin- bzw. Chemokin-Produktion in unstimulierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten (Medium) sowie in murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten, stimuliert durch uninfizierte, lysierte bzw. durch mit *A. phagocytophilum* infizierte, lysierte murine Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Zeit nach Infektion bzw. Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. (A) RANTES. (B) MIP-1 α .

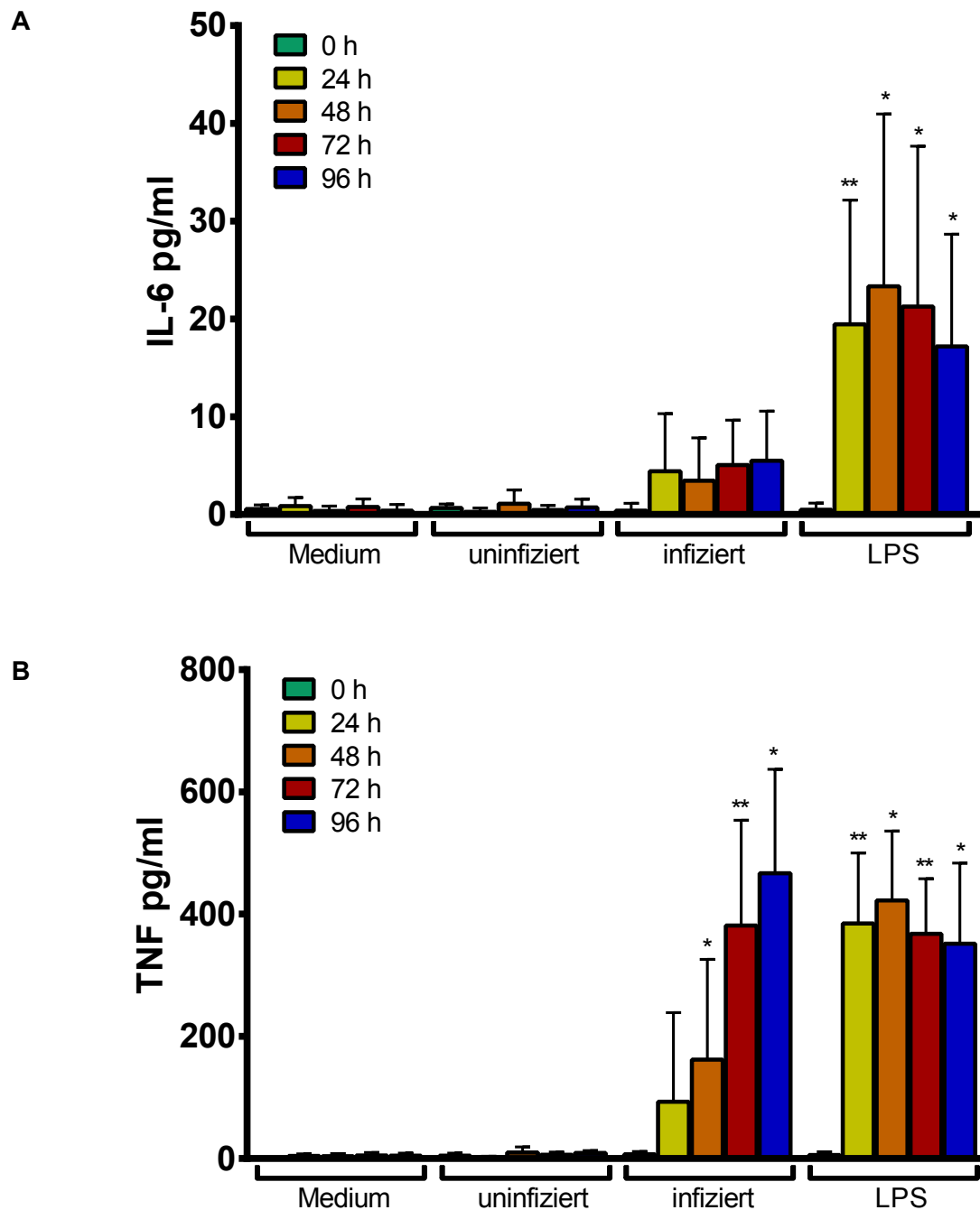


Abbildung 5. Zytokin- bzw. Chemokin-Produktion in unstimulierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten (Medium) sowie in murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten, stimuliert durch uninfizierte, lysierte bzw. durch mit *A. phagocytophilum* infizierte, lysierte murine Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Zeit nach Infektion bzw. Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. (A) IL-6. (B) TNF.

4.4 Die Bedeutung antimikrobieller Effektormechanismen muriner neutrophiler Granulozyten bei der Erregerkontrolle

Bereits im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Freiburg im Breisgau durchgeführte Mausexperimente haben gezeigt, dass die Kontrolle einer *A. phagocytophilum*-Infektion in vivo von den neutrophilen Effektormechanismen wie Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat(NADPH)-Oxidase, induzierbarer Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und Myeloperoxidase (MPO) unabhängig ist [107, 152]. Aufgrund der bestehenden Redundanz des Immunsystems wurde die Bedeutung dieser Effektormechanismen in vitro analysiert. Hierfür waren parallel murine Wildtyp, gp91^{phox}^{-/-}, iNOS^{-/-} und MPO^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten infiziert und der Wachstumsverlauf von *A. phagocytophilum* über 96 h hinweg analysiert worden.

Im Infektionsverlauf der Wildtyp und der Gen-defizienten *Hoxb8*-Granulozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 6). Die ermittelten Daten bekräftigen somit die In-vivo-Ergebnisse des o.g. Freiburger Institutes. Demnach haben antimikrobielle Effektormechanismen neutrophiler Granulozyten keinen direkten Effekt auf das Wachstum von *A. phagocytophilum*.

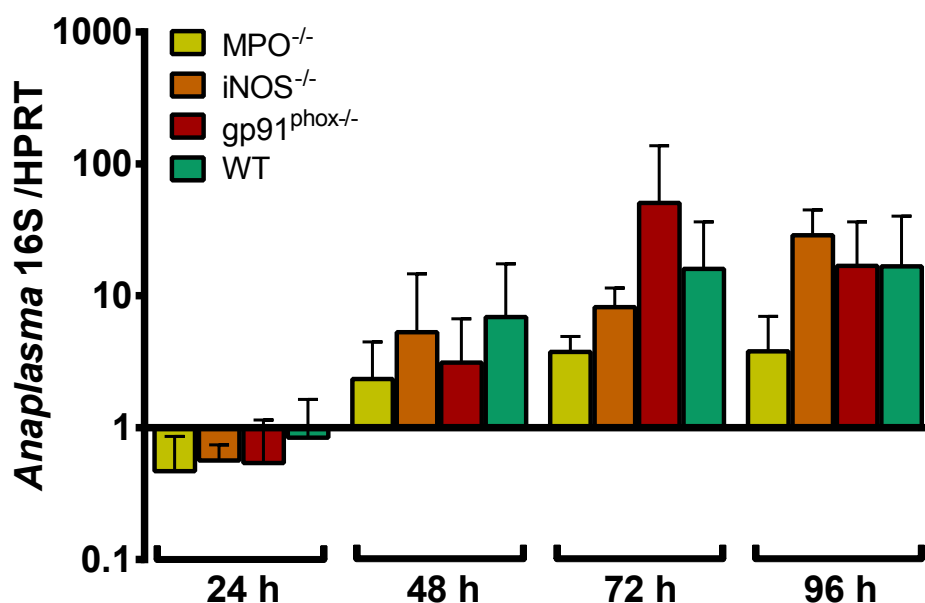


Abbildung 6. Relative Zunahme von *A. phagocytophilum*-spezifischer 16S rRNA, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von murinen WT (Wildtyp), MPO^{-/-}, iNOS^{-/-} und gp91^{phox}^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus sieben unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den jeweiligen 0-h-Wert.

Die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche auch als „respiratory burst“ bezeichnet wird, ist ein wichtiger antibakterieller Mechanismus neutrophiler Granulozyten. Die Generierung von ROS wird hauptsächlich durch den NADPH-Oxidase-Enzymkomplex ermöglicht [150]. Da gp91^{phox} eine wichtige Teilkomponente dieses Komplexes darstellt, wurde in weiteren Untersuchungen dieser Studie die gp91^{phox}-mRNA-Expression in *A. phagocytophilum*-infizierten *Hoxb8*-Granulozyten analysiert.

Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten zeigten keine Regulation oder Induktion von gp91^{phox} durch die Infektion oder durch die LPS-Stimulation (Abbildung 7).

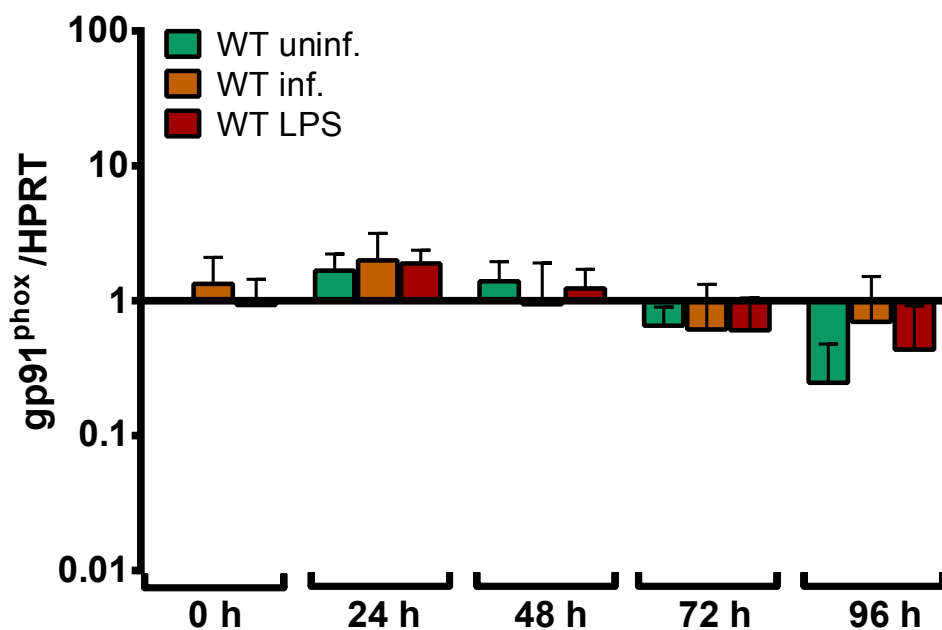


Abbildung 7. Relative gp91^{phox}-mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in uninf. (uninfizierten), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten) und mit LPS (10 ng/ml) stimulierten murinen WT (Wildtyp) *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus sieben unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den 0-h-Wert der uninfizierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten.

Um zu untersuchen, ob in iNOS^{-/-} und MPO^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten eine kompensatorische Hochregulation der gp91^{phox}-Expression erfolgt, wurde dem Infektionsverlauf in den entsprechenden Gen-defizienten *Hoxb8*-Granulozyten nachgegangen. Auch hier ließ sich jedoch keine signifikante Induktion oder Regulation von gp91^{phox} erkennen (Abbildung 8).

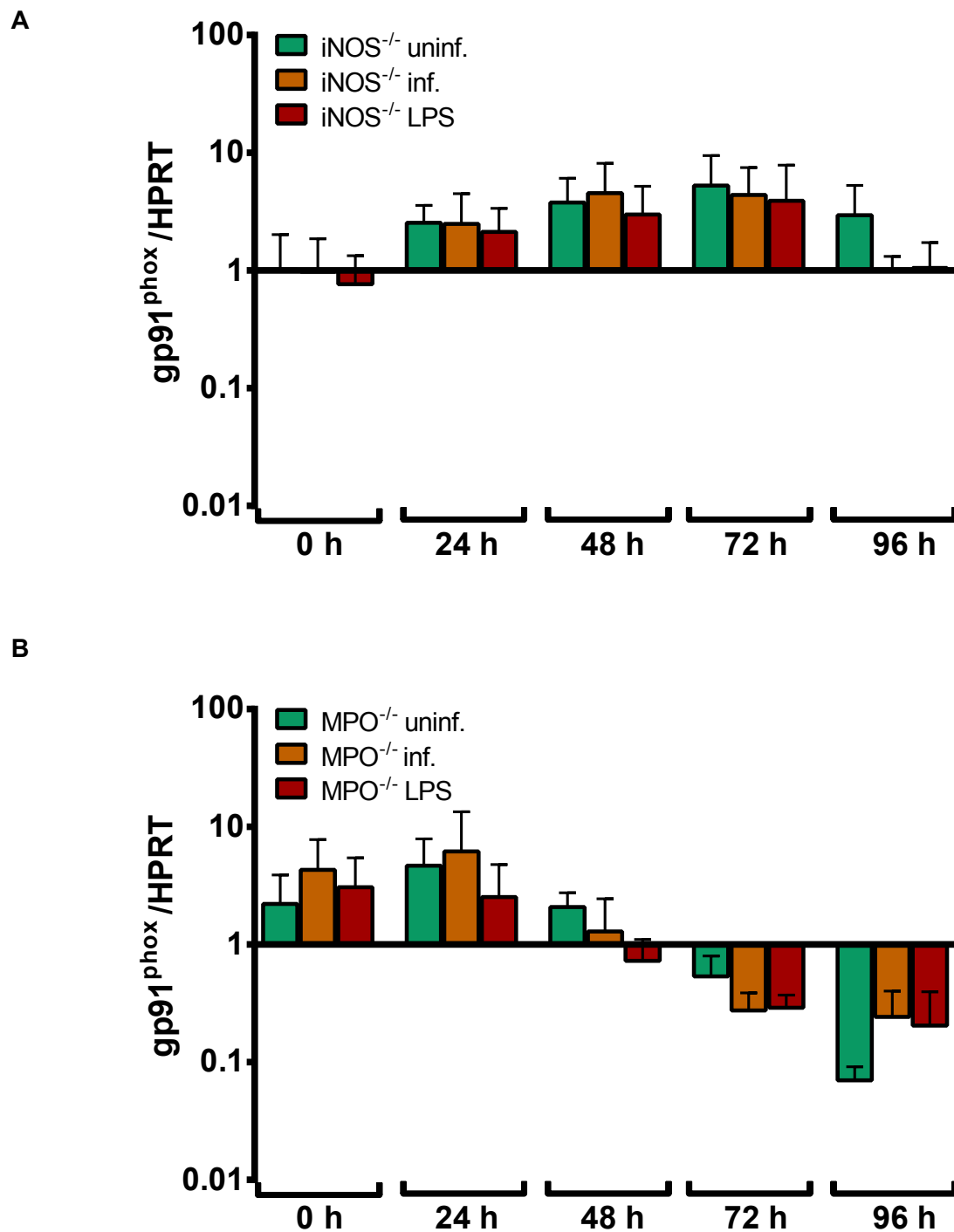


Abbildung 8. Relative $gp91^{phox}$ -mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in uninfl. (uninfizierten), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten) und mit LPS (10 ng/ml) stimulierten murinen $iNOS^{-/-}$ (**A**) und $MPO^{-/-}$ (**B**) *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus sieben unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den 0-h-Wert der uninfizierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten.

Stickstoffmonoxid (NO) und andere reaktive Stickstoffspezies (RNS) werden durch die iNOS generiert und spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem [164]. Dementsprechend wurde in dieser Studie die iNOS-mRNA-Expression in *A. phagocytophilum*-infizierten *Hoxb8*-Granulozyten analysiert.

Die Infektion von Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten mit *A. phagocytophilum* führte zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Induktion der iNOS-mRNA-Expression zu allen Zeitpunkten nach der Infektion, die der durch LPS-Stimulation vergleichbar war (Abbildung 9).

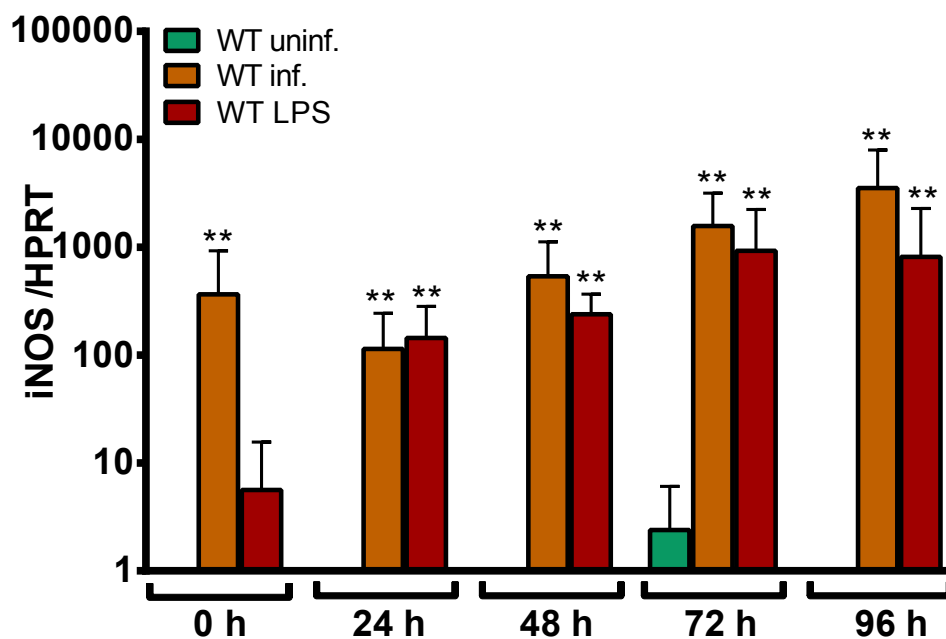


Abbildung 9. Relative iNOS-mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in uninf. (uninfizierten), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten) und mit LPS (10 ng/ml) stimulierten murinen WT (Wildtyp) *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus sieben unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den 0-h-Wert der uninfizierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. ** = $p < 0,01$.

Um zu untersuchen, ob in $gp91^{\text{phox}^{-/-}}$ und $MPO^{-/-}$ *Hoxb8*-Granulozyten eine kompensatorische Hochregulation der iNOS-Expression erfolgt, wurde der Infektionsverlauf in den entsprechenden Gen-defizienten *Hoxb8*-Granulozyten verfolgt. Es zeigte sich eine ca. 100-fach erhöhte iNOS-Expression in den uninfizierten $gp91^{\text{phox}^{-/-}}$ *Hoxb8*-Granulozyten (Abbildung 10 A). Ein ähnliches Phänomen wurde in den uninfizierten $MPO^{-/-}$ *Hoxb8*-Granulozyten beobachtet (Abbildung 10 B).

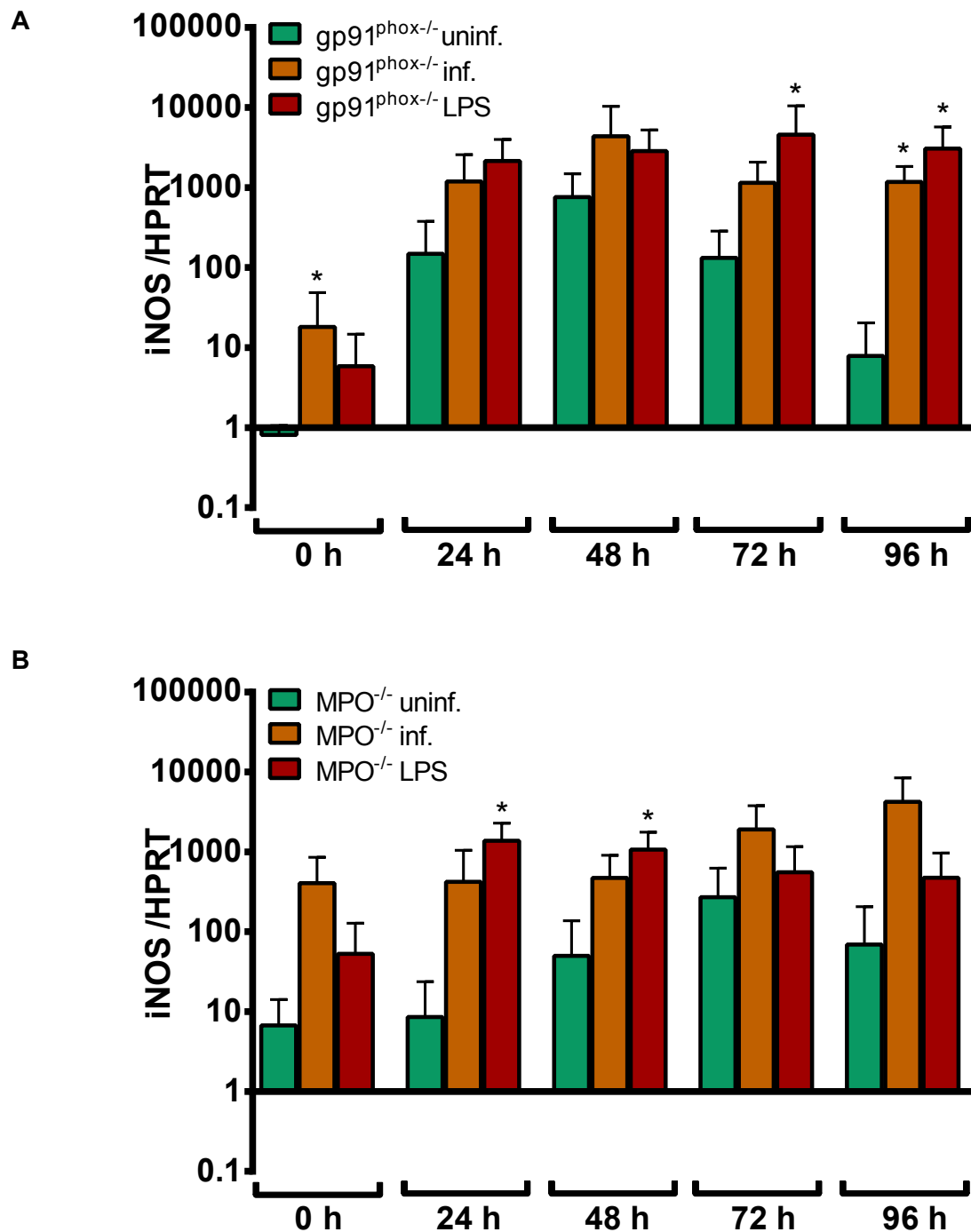


Abbildung 10. Relative iNOS-mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in uninfl. (uninfizierten), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten) und mit LPS (10 ng/ml) stimulierten murinen gp91^{phox-/-} (**A**) und MPO^{-/-} (**B**) *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus sieben unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den 0-h-Wert der uninfl. murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. * = $p < 0,05$.

Aufgrund der deutlichen Induktion der iNOS-mRNA-Expression wurde mittels Griess-Assay der Gehalt an Nitrit in den Zellkultur-Überständen als Maß für die Aktivität der iNOS analysiert.

Mit Ausnahme der $gp91^{phox-/-}$ *Hoxb8*-Granulozyten war eine signifikante Produktion von Nitrit in den Zellkultur-Überständen nicht nachweisbar. In $gp91^{phox-/-}$ *Hoxb8*-Granulozyten wurde eine zwar signifikante ($p < 0,05$), aber gering-gradige Produktion von Nitrit nach 72 h und 96 h beobachtet, die bei Stimulation durch LPS deutlicher ausfiel (Abbildung 11).

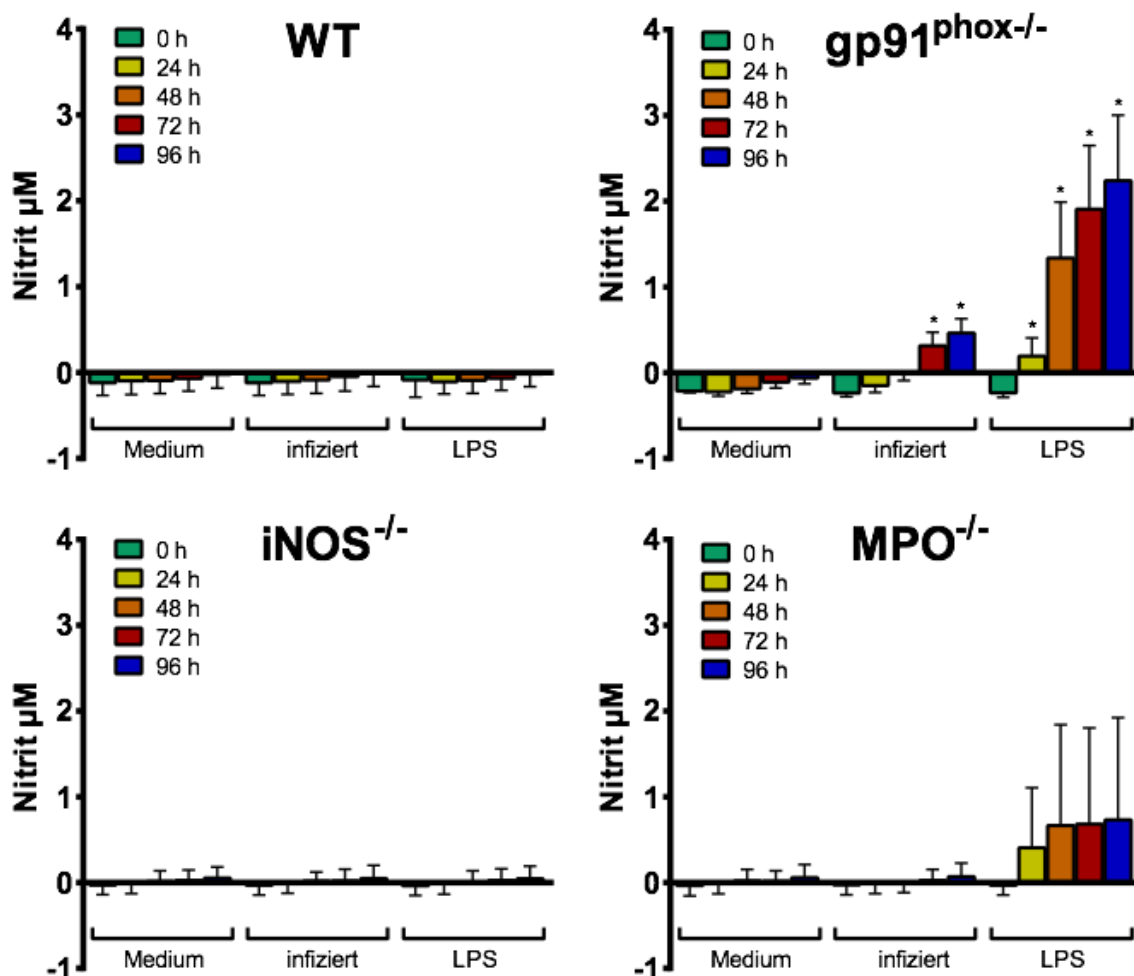


Abbildung 11. Nitritgehalt von Zellkultur-Überständen uninfizierter (Medium), *A. phagocytophilum*-infizierter und mit LPS (10 ng/ml) stimulierter muriner WT (Wildtyp), $MPO^{-/-}$, $iNOS^{-/-}$ und $gp91^{phox-/-}$ *Hoxb8*-Granulozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus sieben unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$.

MPO ist ein weiteres wichtiges Enzym neutrophiler Granulozyten, welches unter anderem den Umbau der Produkte der NADPH-Oxidase zu antimikrobiell wirksamen HOCl (hypochlorige Säure) katalysiert [197]. Die Effektivität der antimikrobiellen Wirkung durch dieses Enzym in vivo wird jedoch sehr unterschiedlich beschrieben. Dennoch zeigen einige In-vivo- und In-vitro-Studien die Beteiligung der MPO bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen [169].

Bei dieser Studie konnte in Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten keine signifikante MPO-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 12). Wurde im Gegensatz dazu die MPO-Expression in *gp91^{phox-/-}* und *iNOS^{-/-}* *Hoxb8*-Granulozyten auf die Expression in Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten normalisiert (Abbildung 13 A und B), zeigte sich eine etwa 100-fach erhöhte Grund-Expression von MPO, die jedoch von der Infektion unabhängig war. Demnach führen die *gp91^{phox-/-}* und die *iNOS*-Defizienz zu einer kompensatorischen Hochregulation der MPO-mRNA-Expression.

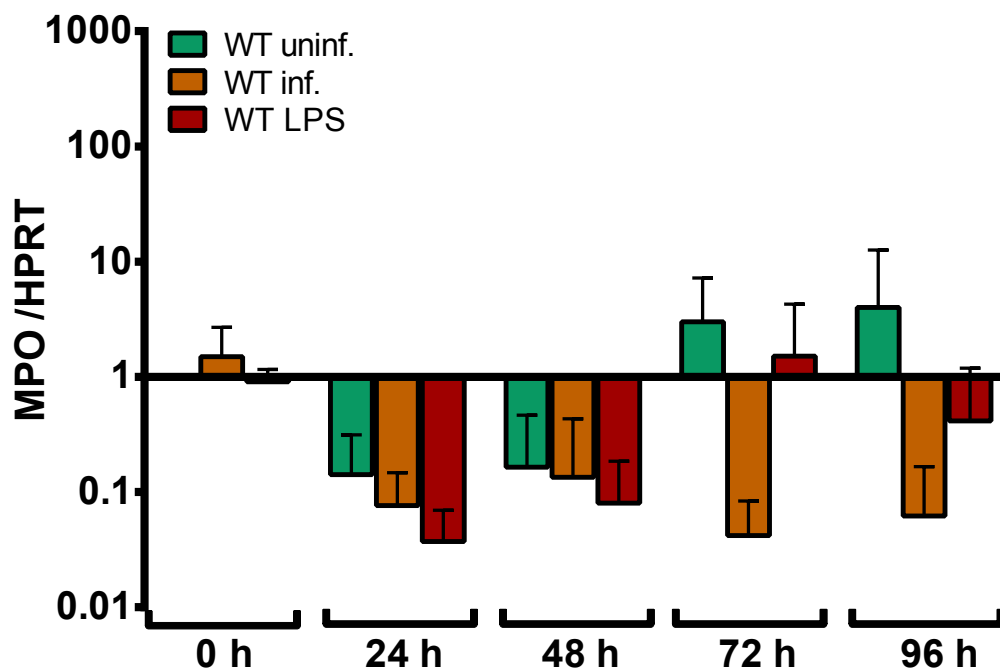


Abbildung 12. Relative MPO-mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in uninf. (uninfizierten), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten) und mit LPS (10 ng/ml) stimulierten murinen WT (Wildtyp) *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus sieben unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den 0-h-Wert der uninfizierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten.

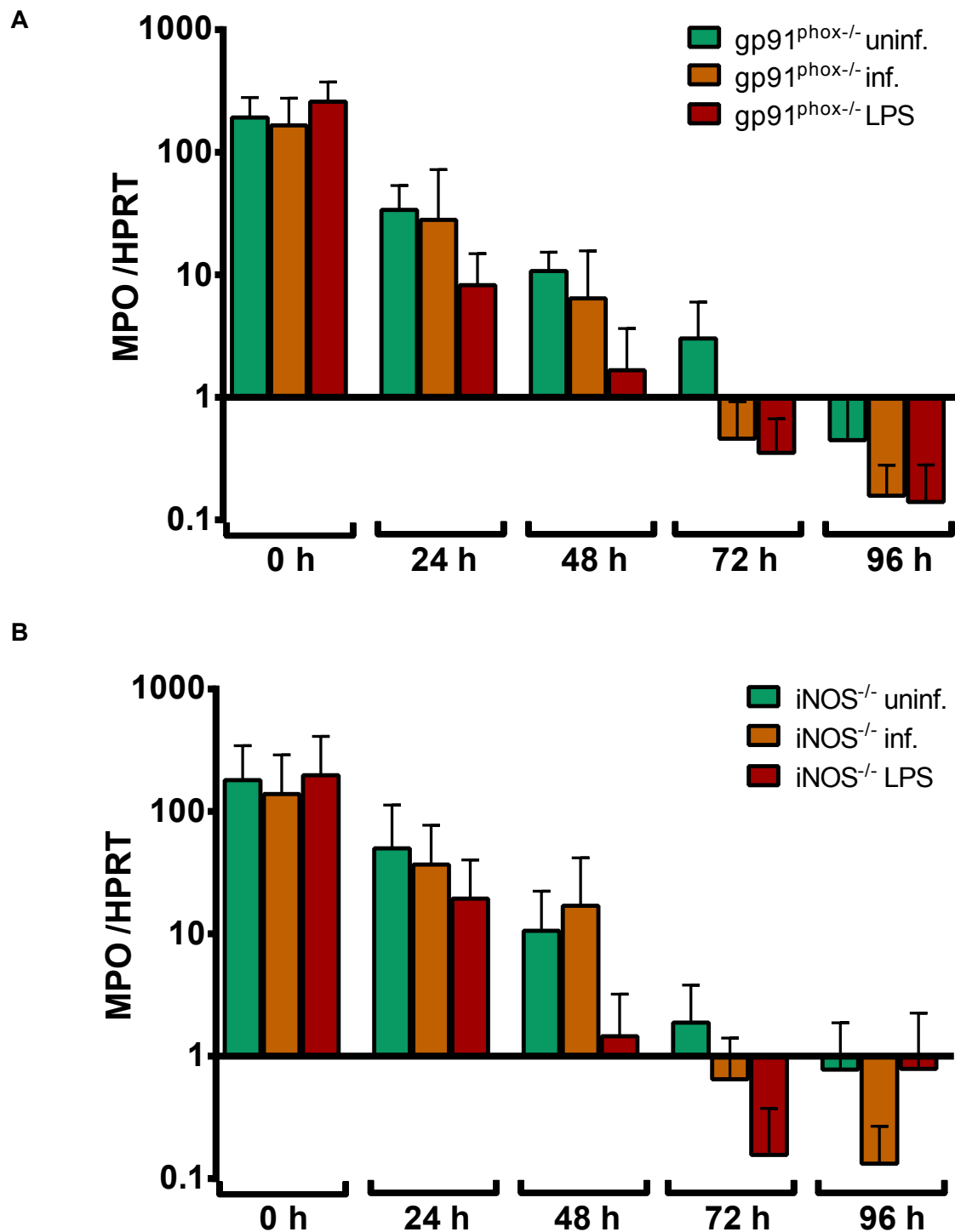


Abbildung 13. Relative MPO-mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in uninf. (uninfizierten), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten) und mit LPS (10 ng/ml) stimulierten murinen gp91^{phox-/-} (**A**) und iNOS^{-/-} (**B**) *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus sieben unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den 0-h-Wert der uninfizierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten.

4.5 Die Funktion von murinen Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen bei der Infektion durch *A. phagocytophilum*

In Richtung Monozyten-Makrophagen differenzierte HL60-Zellen [121] sowie murine Knochenmarks-Makrophagen [122] unterstützen die Replikation von *A. phagocytophilum* nicht. Es ist jedoch nicht vollständig klar, ob Makrophagen durch *A. phagocytophilum* aktiviert werden und ob die antimikrobiellen Effektormechanismen von Makrophagen an der Erregerkontrolle beteiligt sind.

Daher ist für diese Studie in weiteren Versuchen analysiert worden, ob *A. phagocytophilum* in der Lage ist, murine Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen bzw. *Hoxb8*-Makrophagen zu aktivieren bzw. zu infizieren, und ob der Erreger in Makrophagen effektiv abgetötet wird. Dazu wurden murine *Hoxb8*-Makrophagen mit *A. phagocytophilum* infiziert und der Infektionsverlauf mit dem in *Hoxb8*-Granulozyten verglichen. Die Ergebnisse zeigten bereits nach 24 h eine signifikante ($p < 0,01$) Abnahme der Erregerlast in den Ansätzen mit den *Hoxb8*-Makrophagen, während in den Ansätzen mit *Hoxb8*-Granulozyten ein deutliches bakterielles Wachstum beobachtet wurde (Abbildung 14). Im Zytospin wurden ebenfalls mikroskopisch keine Morulae in *Hoxb8*-Makrophagen nachgewiesen. Demnach ist *A. phagocytophilum* nicht in der Lage, in murinen *Hoxb8*-Makrophagen zu replizieren.

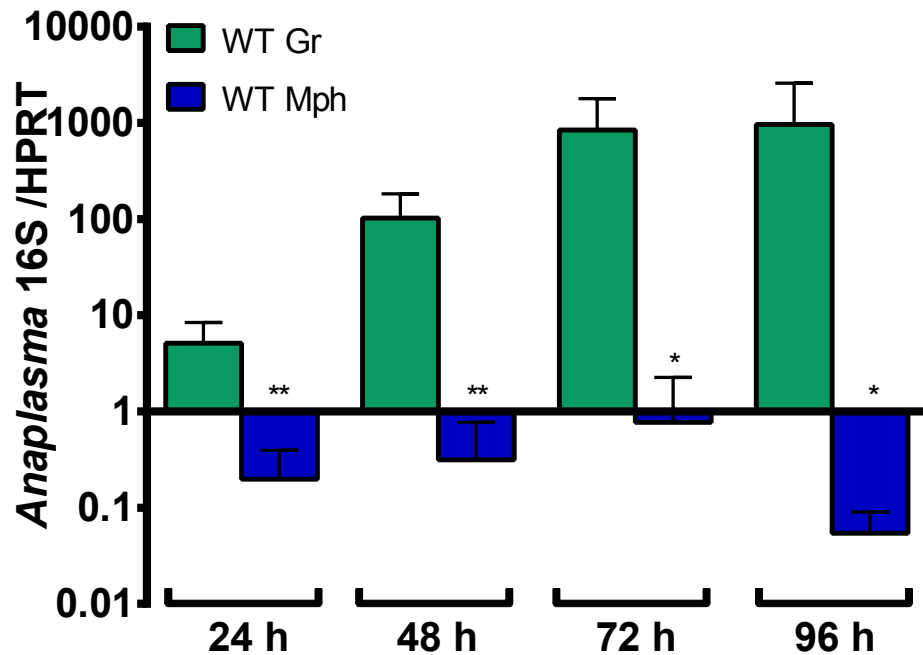


Abbildung 14. Relative Zunahme von *A. phagocytophilum*-spezifischer 16S rRNA, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von murinen WT Gr (Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten) und murinen WT Mph (Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen). Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den jeweiligen 0-h-Wert. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ (Vergleich murine Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten und murine Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen).

Die Messung von Zytokinen bzw. Chemokinen im Zellkultur-Überstand der *Hoxb8*-Makrophagen ergab im Gegensatz zu den *Hoxb8*-Granulozyten keine signifikante Produktion von RANTES, MIP-1 α (Abbildung 15), IL-6 oder TNF (Abbildung 16). Die Stimulation durch das als Positivkontrolle verwendete LPS zeigte jedoch, dass *Hoxb8*-Makrophagen im Prinzip in der Lage sind, diese Mediatoren zu produzieren. Demnach werden murine *Hoxb8*-Makrophagen durch eine *A. phagocytophilum*-Stimulation nicht aktiviert.

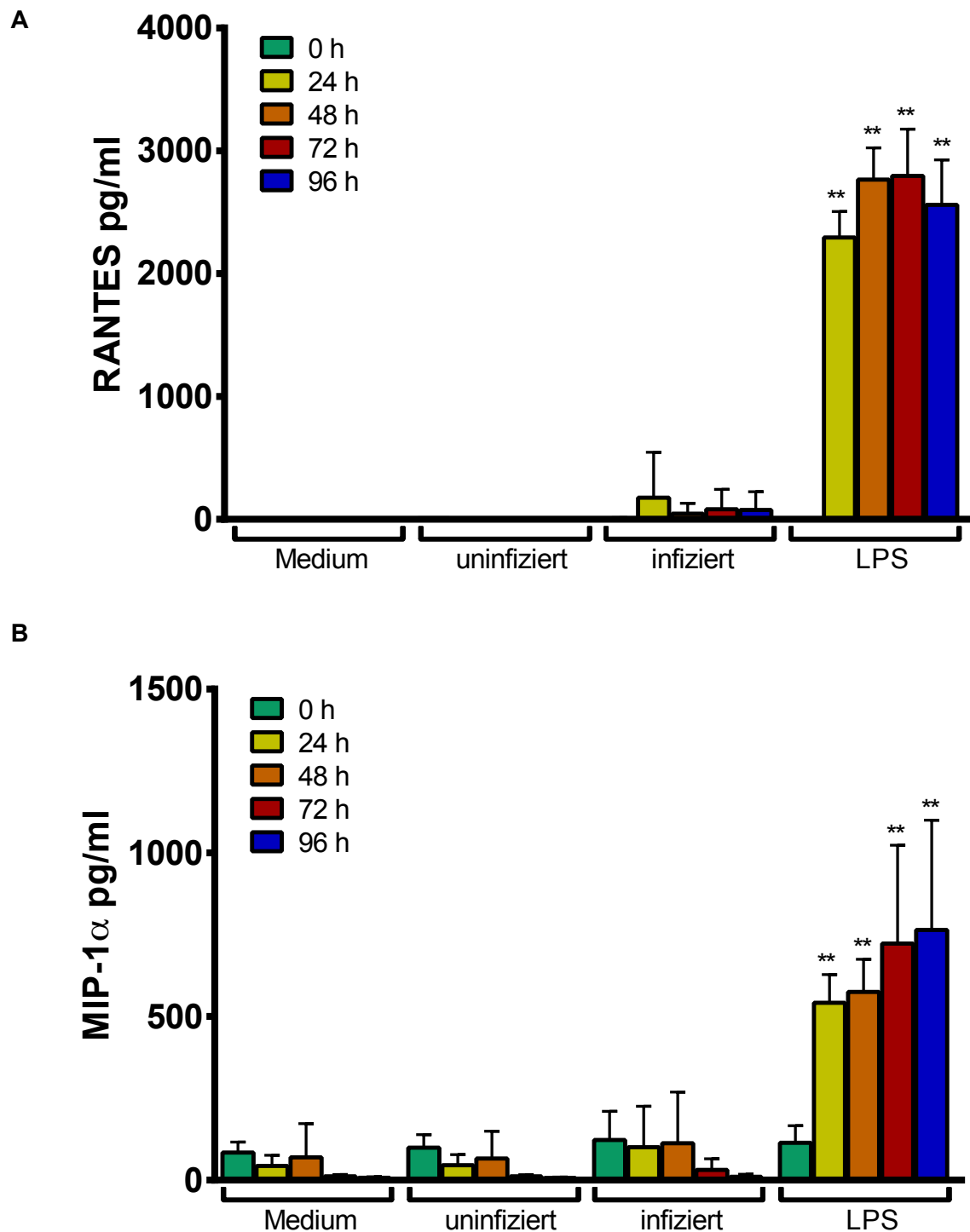


Abbildung 15. Zytokin- bzw. Chemokin-Produktion in unstimulierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen (Medium) sowie in murinen Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen, stimuliert durch uninizierte, lysierte bzw. durch mit *A. phagocytophilum* infizierte, lysierte murine Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Zeit nach Infektion bzw. Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten.

** = $p < 0,0$. (A) RANTES. (B) MIP-1 α .

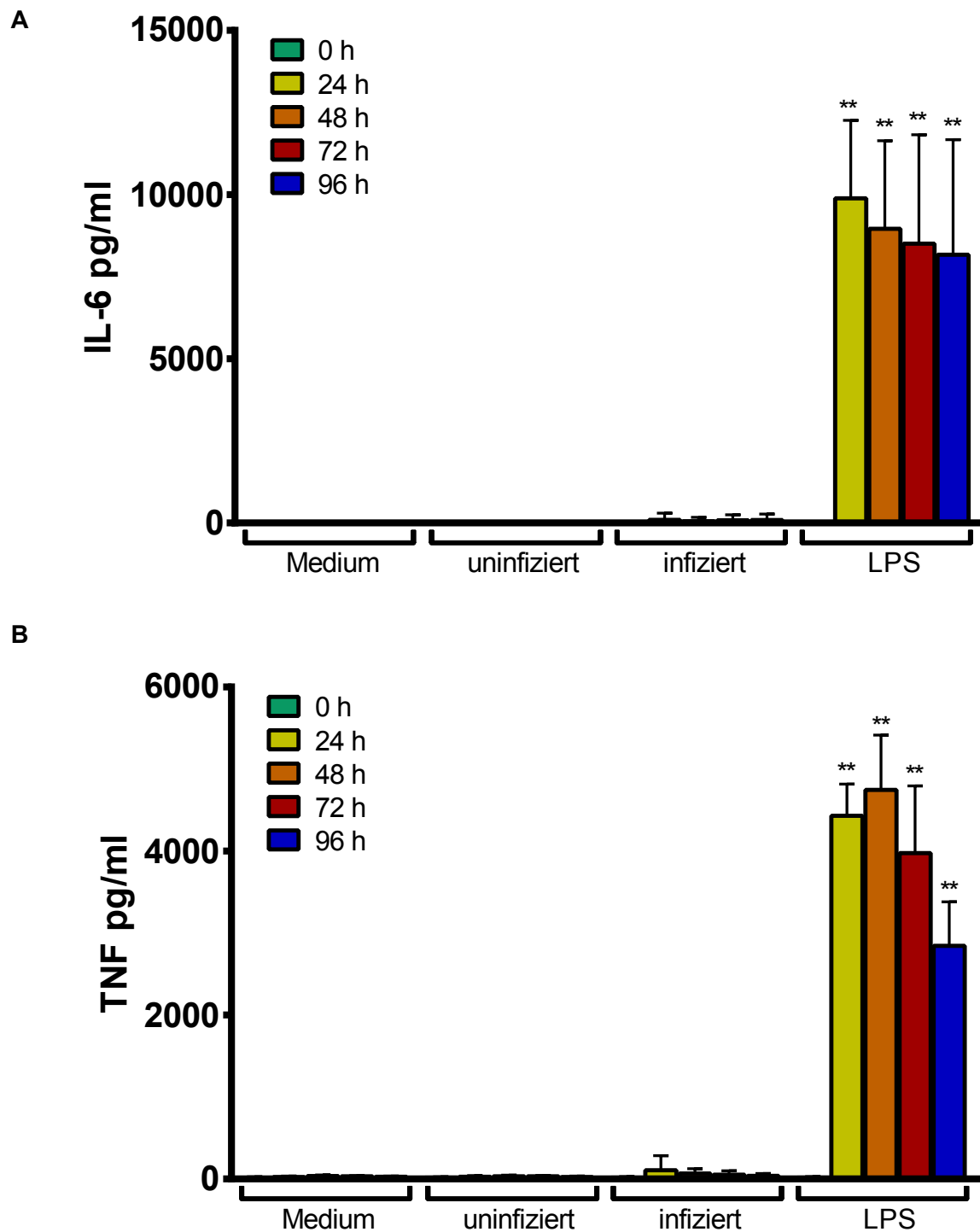


Abbildung 16. Zytokin- bzw. Chemokin-Produktion in unstimulierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen (Medium) sowie in murinen Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen, stimuliert durch uninzierte, lysierte bzw. durch mit *A. phagocytophilum* infizierte, lysierte murine Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Zeit nach Infektion bzw. Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten.

** = $p < 0,01$. (A) IL-6. (B) TNF.

4.6 Die Bedeutung antimikrobieller Effektormechanismen von murinen *Hoxb8*-Makrophagen bei der Infektion mit *A. phagocytophilum*

Monozyten/Makrophagen sind ebenfalls mit den antimikrobiellen Effektormechanismen NADPH-Oxidase, iNOS und MPO ausgestattet [153, 197, 198]. Daher wurde für diese Studie in weiteren Versuchen analysiert, ob *A. phagocytophilum* in Abwesenheit dieser Effektormechanismen in der Lage ist, in *Hoxb8*-Makrophagen zu replizieren. Wie bereits bei den Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen hat sich nachweisen lassen, dass sich der Erreger auch in den Gen-defizienten Makrophagen nicht vermehren kann (Abbildung 17).

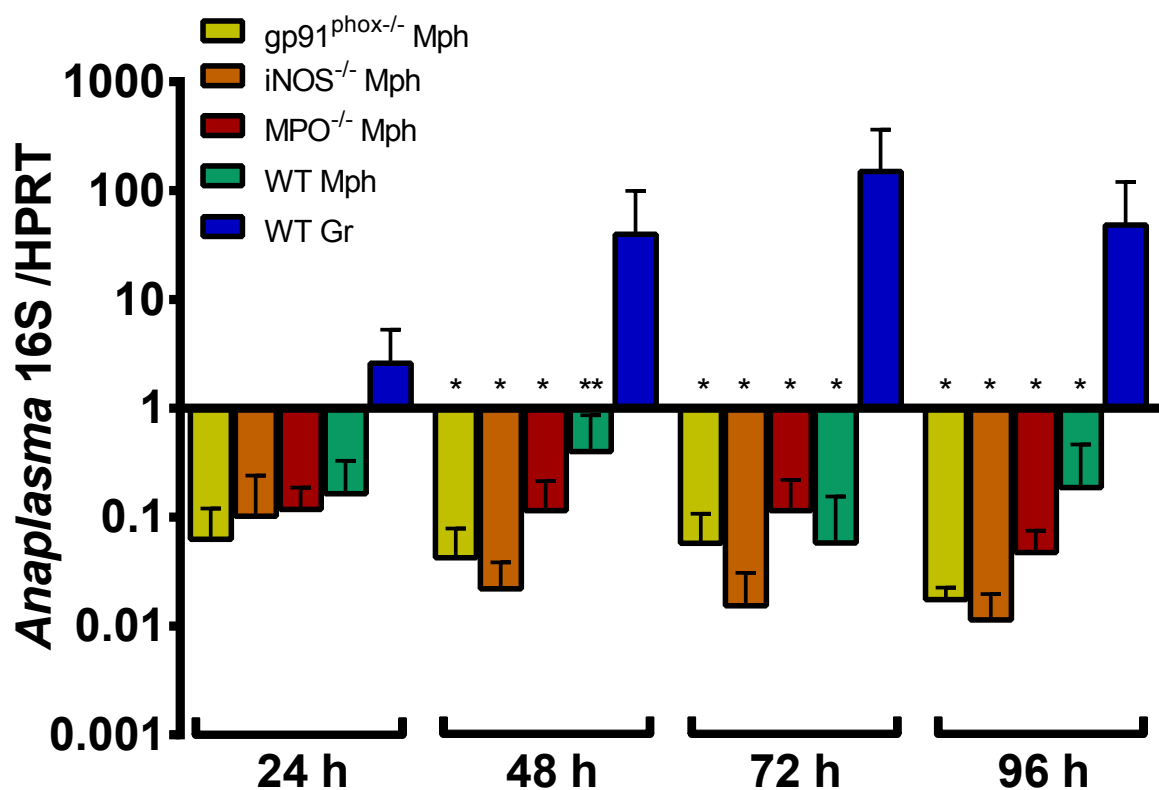


Abbildung 17. Relative Zunahme von *A. phagocytophilum*-spezifischer 16S rRNA, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von murinen WT (Wildtyp), gp91^{phox-/-}, iNOS^{-/-} und MPO^{-/-} Mph (*Hoxb8*-Makrophagen) sowie murinen WT Gr (Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten). Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den jeweiligen 0-h-Wert. * = p < 0,05; ** = p < 0,01.

Um zu ermitteln, ob die genannten Effektormechanismen durch eine Infektion in *Hoxb8*-Makrophagen aktiviert werden, sind die gp91^{phox}-, iNOS- und MPO-mRNA-Expressionen analysiert worden.

Murine *Hoxb8*-Makrophagen zeigten im Vergleich zu unstimulierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-neutrophilen Granulozyten unabhängig von der Infektion oder Stimulation eine deutlich erhöhte iNOS-mRNA-Expression. Eine Induktion der iNOS-mRNA-Expression durch eine *A. phagocytophilum*-Infektion wurde nicht beobachtet. Lediglich die LPS-Stimulation führte nach 24 h zu einem signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg (Abbildung 18). Diese Steigerung wurde insbesondere dann deutlich, wenn auf die iNOS-Expression in unstimulierten (Medium) *Hoxb8*-Granulozyten zum Zeitpunkt 0 h normalisiert wurde (Abbildung 19).

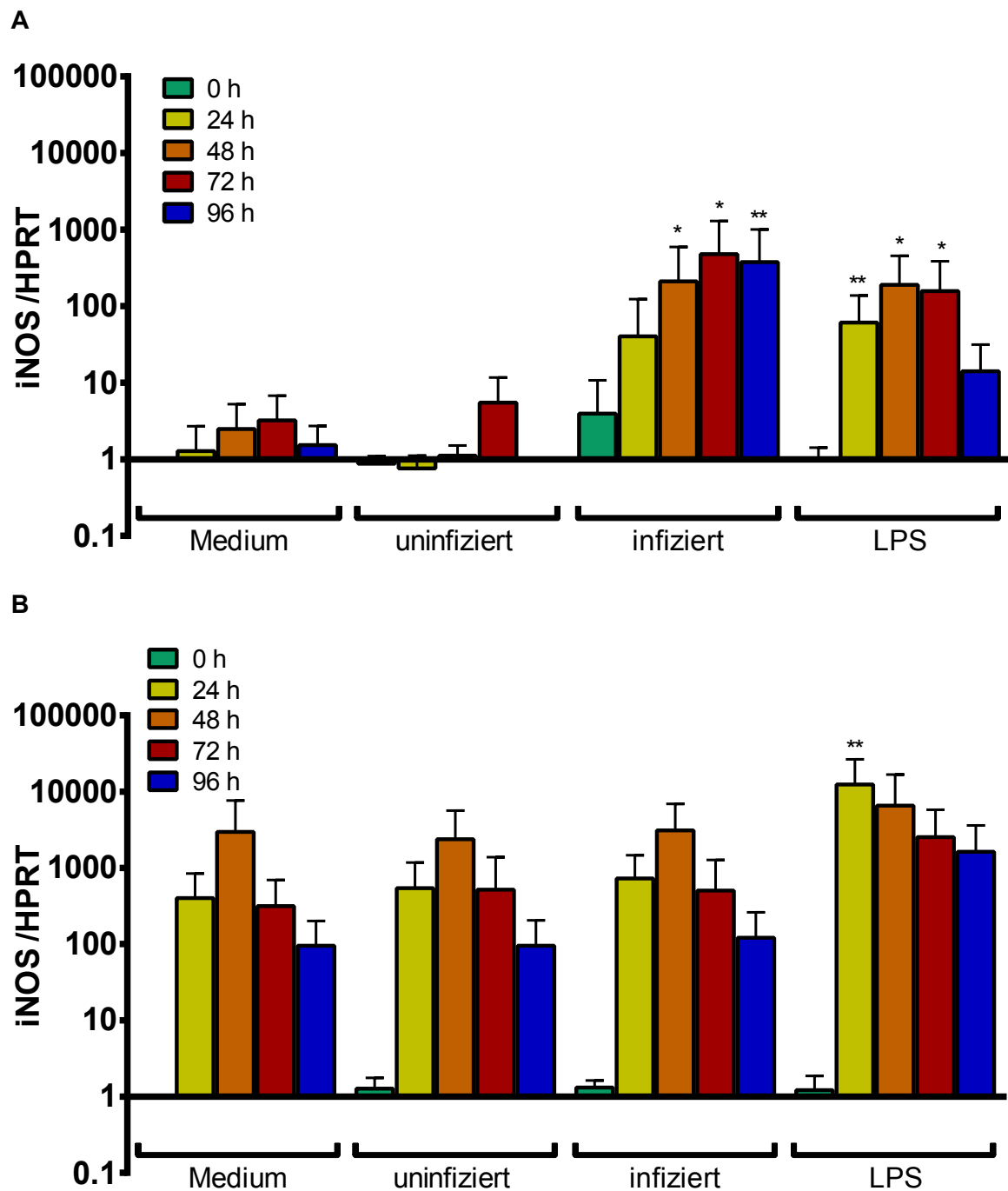


Abbildung 18. Relative iNOS-mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl in unstimulierten (Medium) murinen *Hoxb8*-Zellen als auch in murinen *Hoxb8*-Zellen, die mit uninfizierten, lysierten bzw. mit *A. phagocytophilum*-infizierten, lysierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten stimuliert wurden. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den jeweiligen 0-h-Wert. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. **(A)** murine Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. **(B)** murine Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen.

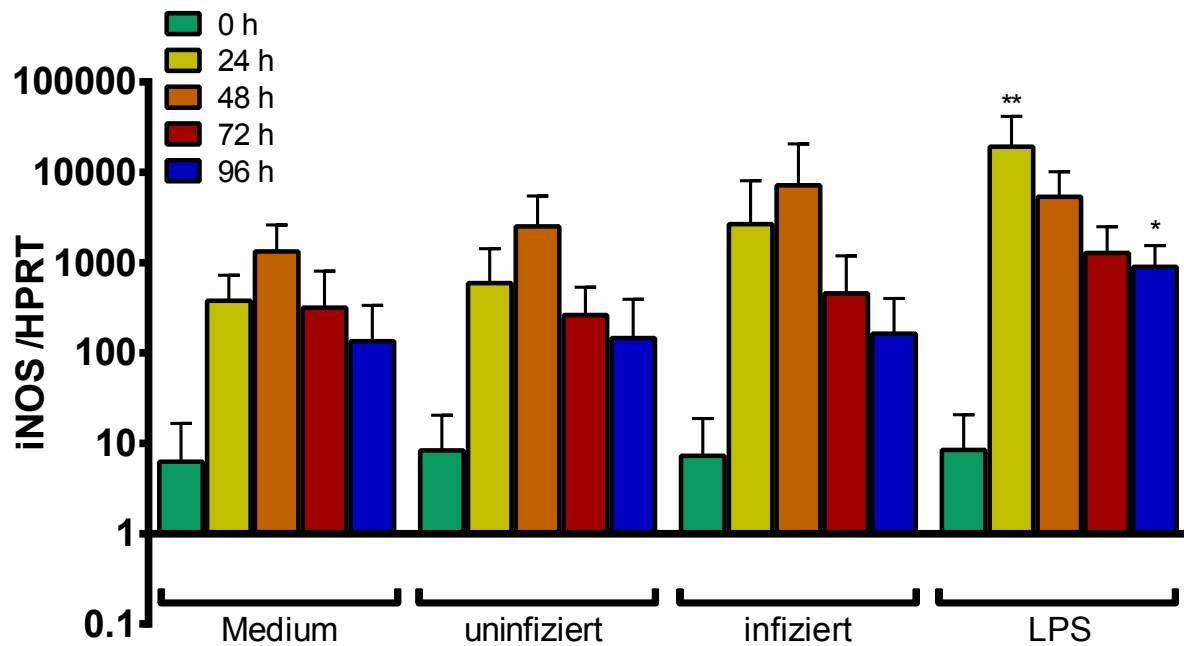


Abbildung 19. Relative iNOS-mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl in unstimulierten (Medium) murinen Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen als auch in murinen Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen, die mit uninfizierten, lysierten bzw. mit *A. phagocytophilum*-infizierten, lysierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten stimuliert wurden. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 10 ng/ml LPS. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den 0-h-Wert in unstimulierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Um zu untersuchen, ob der Defekt für $gp91^{phox-/-}$ und $MPO^{-/-}$ einen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Expression in *Hoxb8*-Makrophagen hat, wurde die iNOS-mRNA-Expression in den entsprechenden Gen-defizienten *Hoxb8*-Makrophagen analysiert. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zur iNOS-mRNA-Expression in Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen (Abbildung 20). Im Gegensatz zum vorher beschriebenen Experiment war jetzt im Vergleich zu den unstimulierten Ansätzen (Medium) eine signifikante iNOS-mRNA-Induktion durch die *A. phagocytophilum*-Infektion nach 24 h in Wildtyp und $gp91^{phox-/-}$ *Hoxb8*-Makrophagen ($p < 0,01$, $p < 0,05$) bzw. nach 48 h in den $MPO^{-/-}$ *Hoxb8*-Makrophagen ($p < 0,05$) nachweisbar, die jedoch quantitativ gering ausfiel. Auch die iNOS-mRNA-Induktion durch die LPS-Stimulation war deutlicher ausgeprägt als beim vorher beschriebenen Experiment.

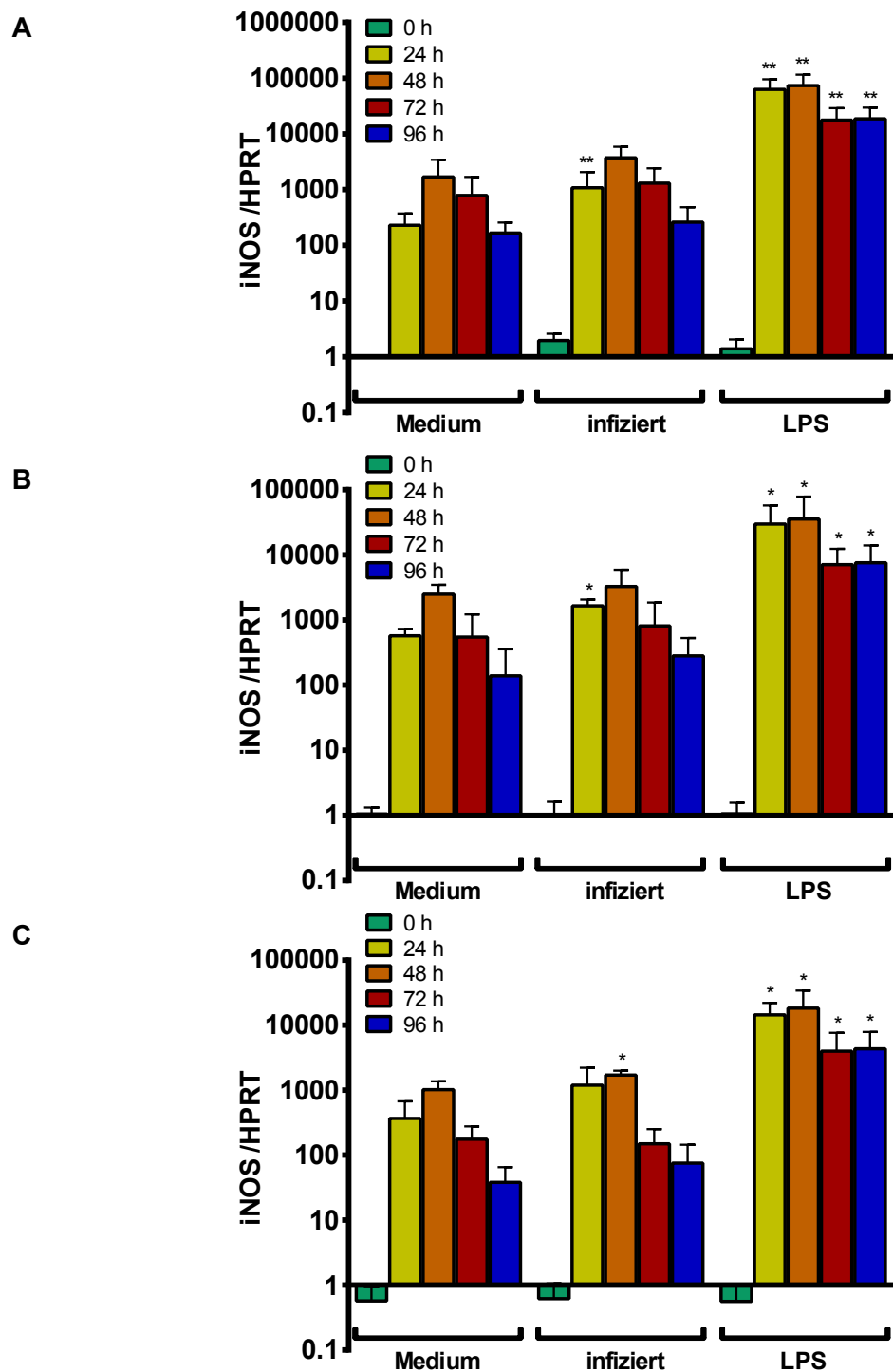


Abbildung 20. Relative iNOS-mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in uninanzierten, *A. phagocytophilum*-infizierten und mit LPS (10 ng/ml) stimulierten murinen Wildtyp (**A**), $gp91^{phox-/-}$ (**B**) und $MPO^{-/-}$ (**C**) *Hoxb8*-Makrophagen. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den 0-h-Wert der uninanzierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Zusätzlich wurde der Nitritgehalt im Überstand der jeweiligen Zellen analysiert. Dies ergab – wie zu erwarten war – eine signifikante Zunahme der Nitrit-Produktion in LPS stimulierten Wildtyp, gp91^{phox}^{-/-} und MPO^{-/-} *Hoxb8*-Makrophagen ($p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,05$). In den mit *A. phagocytophilum* infizierten Ansätzen war keine signifikante Nitrit-Produktion nachweisbar. iNOS^{-/-} *Hoxb8*-Makrophagen produzierten aufgrund ihres Gen-Defektes kein Nitrit nach LPS-Stimulation (Abbildung 21).

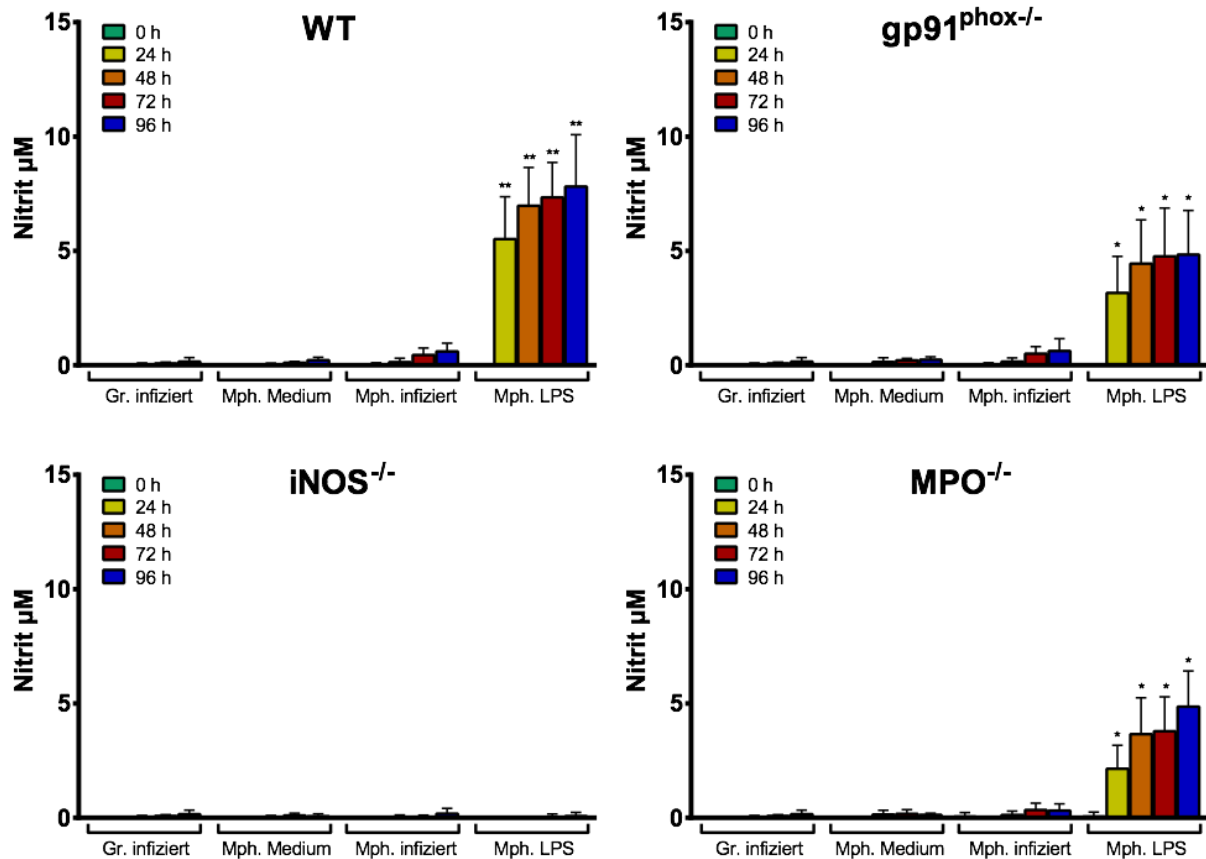


Abbildung. 21 Nitritgehalt der Zellkultur-Überstände uninfizierter, *A. phagocytophilum*-infizierter und mit LPS (10 ng/ml) stimulierter muriner WT (Wildtyp), gp91^{phox}^{-/-}, iNOS^{-/-} und MPO^{-/-} Mph (*Hoxb8*-Makrophagen) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion. Zum Vergleich wurden *A. phagocytophilum*-infizierte murine Wildtyp Gr (*Hoxb8*-Granulozyten) mitgeführt. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Im Gegensatz zu den *Hoxb8*-Granulozyten führte die Stimulation mit LPS zu einer signifikanten Induktion der gp91^{phox}-mRNA-Expression in Wildtyp, iNOS^{-/-} und MPO^{-/-} *Hoxb8*-Makrophagen ($p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,05$, Abbildung 22).

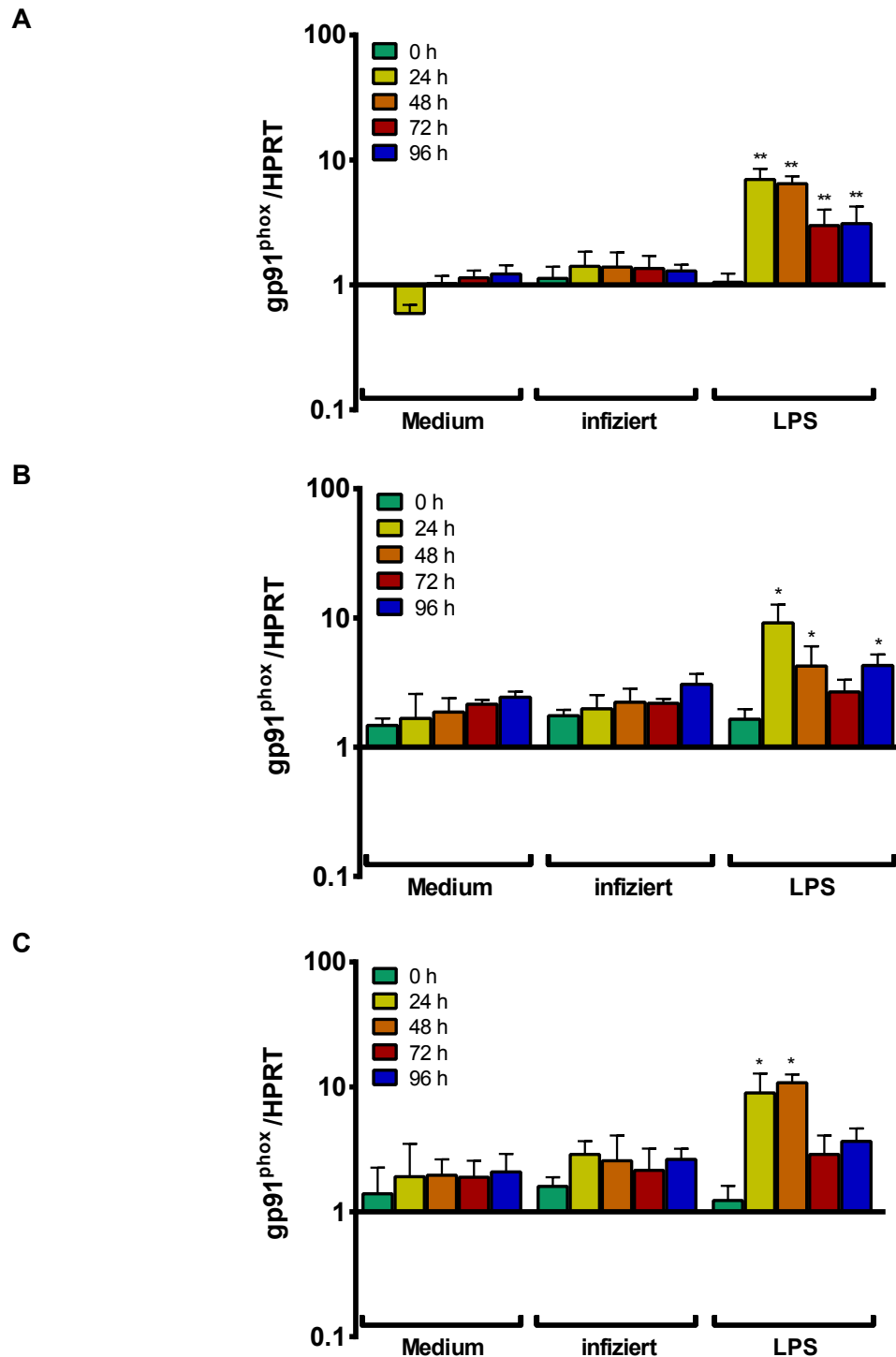


Abbildung 22. Relative gp91^{phox}-mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in uninfizierten, *A. phagocytophilum*-infizierten und in mit LPS (10 ng/ml) stimulierten murinen Wildtyp (A), iNOS^{-/-} (B) und MPO^{-/-} (C) *Hoxb8*-Makrophagen. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den 0-h-Wert der uninfizierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Makrophagen. * = p < 0,05; ** = p < 0,01.

In Wildtyp, gp91^{phox-/-} und iNOS^{-/-} *Hoxb8*-Makrophagen war ähnlich wie in Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten kaum eine MPO-mRNA-Expression nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass *A. phagocytophilum* nicht in der Lage ist, in *Hoxb8*-Makrophagen zu replizieren, und dass keine wesentliche Induktion von Zytokinen bzw. Chemokinen sowie wichtiger antimikrobieller Effektormechanismen durch die Infektion erfolgt.

4.7 Die Bedeutung von IFN- γ bei der Kontrolle von *A. phagocytophilum*

IFN- γ führt unter anderem zu einer verstärkten antimikrobiellen Aktivität neutrophiler Granulozyten gegenüber einer Vielzahl von Bakterien [199]. Außerdem setzen neutrophile Granulozyten durch IFN- γ induzierbare Chemokine frei, welche wiederum Immunabwehrmechanismen gegenüber intrazellulären Erregern induzieren [200].

Zu untersuchen war deshalb, ob die Stimulation von *Hoxb8*-Granulozyten durch IFN- γ einen direkten Einfluss auf das Wachstum von *A. phagocytophilum* in *Hoxb8*-Granulozyten hat. Im Vergleich zu unstimulierten *Hoxb8*-Granulozyten führte die Stimulation mit IFN- γ zu einem signifikant ($p < 0,01$) reduzierten Wachstum von *A. phagocytophilum* 48 h bis 96 h nach der Infektion (Abbildung 23).

Es wurden ebenfalls die gp91^{phox}-, iNOS- und MPO-mRNA-Expressionen analysiert, um zu untersuchen, ob diese durch IFN- γ induziert werden. Es wurde jedoch keine Regulation oder Induktion der gp91^{phox}- oder MPO-mRNA-Expression durch die IFN- γ -Stimulation festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die IFN- γ -Stimulation uninfizierter *Hoxb8*-Granulozyten zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg der iNOS-mRNA-Expression führte (Abbildung 24).

Darüber hinaus wurde der Nitritgehalt in den Zellkultur-Überständen mittels Griess-Assay gemessen. Lediglich in infizierten und gleichzeitig mit IFN- γ stimulierten Überständen war ein signifikanter ($p < 0,01$) Nitritanstieg nach 48 h bis 96 h nachweisbar (Abbildung 25).

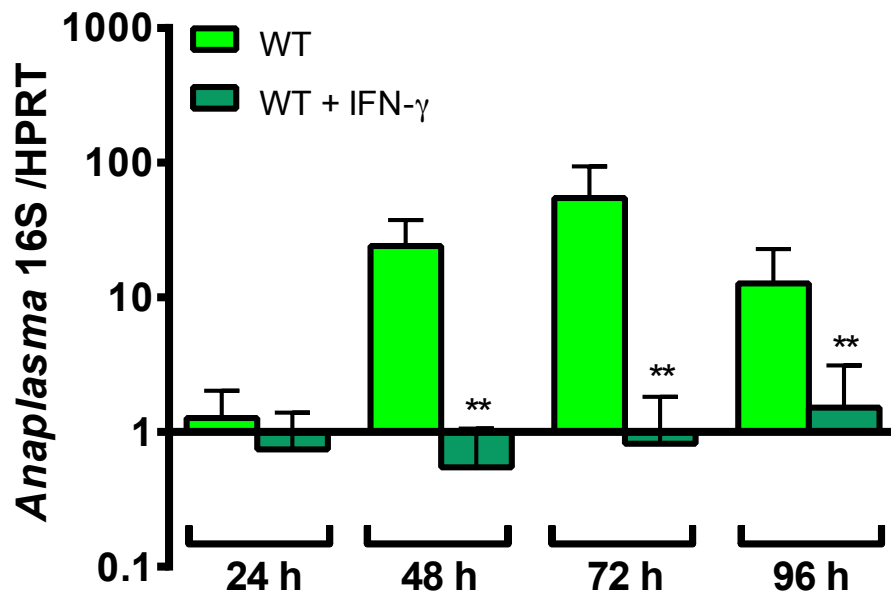


Abbildung 23. Relative Zunahme von *A. phagocytophilum*-spezifischer 16S rRNA, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von unstimulierten und mit IFN- γ (40 ng/ml) stimulierten murinen WT (Wildtyp) *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den jeweiligen 0-h-Wert. ** = $p < 0,01$.

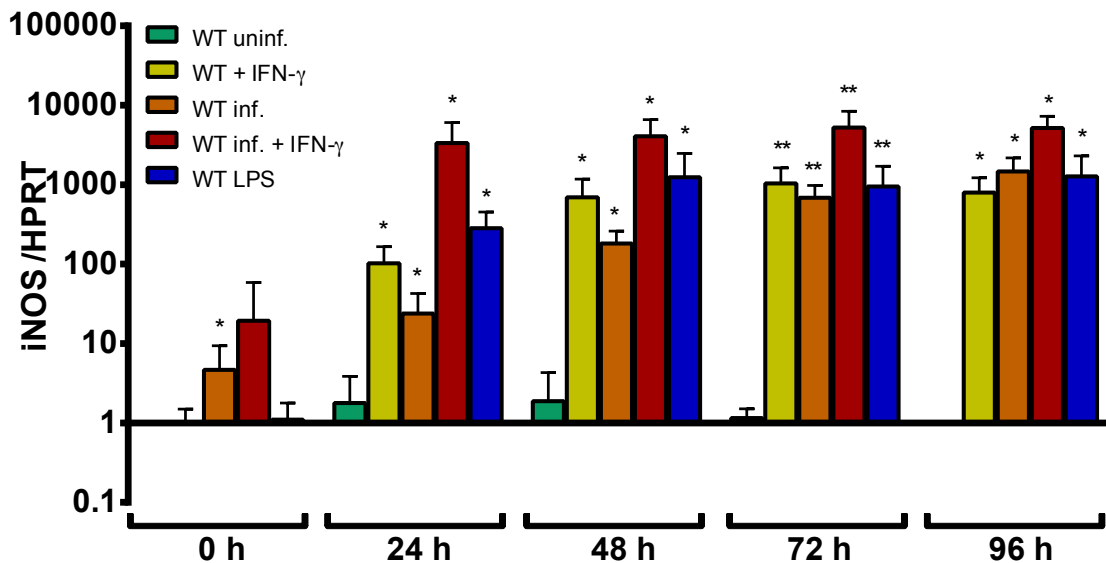


Abbildung 24. Relative iNOS-mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in uninferierten, IFN- γ -stimulierten (40 ng/ml), *A. phagocytophilum*-infizierten, *A. phagocytophilum*-infizierten und zudem mit IFN- γ stimulierten sowie in mit LPS (200 ng/ml) stimulierten murinen WT (Wildtyp) *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den 0-h-Wert der uninferierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

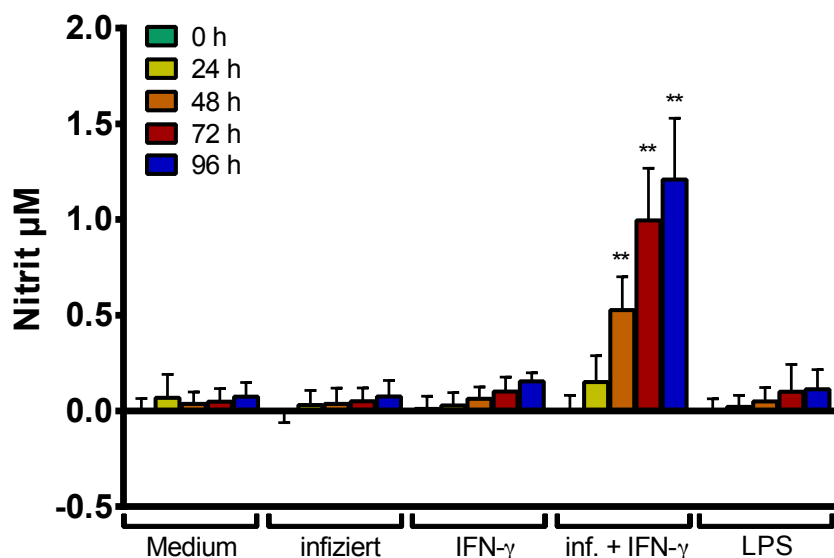


Abbildung 25. Nitritgehalt der Zellkultur-Überstände in uninferierten, IFN- γ -stimulierten (40 ng/ml), *A. phagocytophilum*-infizierten, *A. phagocytophilum*-infizierten und mit IFN- γ stimulierten sowie in mit LPS (200 ng/ml) stimulierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. ** = $p < 0,01$.

Außerdem sind die Zytokin- und die Chemokin-Produktion in Folge der Stimulation mit IFN- γ analysiert worden.

Nach 24 h bis 96 h zeigte sich im Vergleich zu den unstimulierten Ansätzen ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der RANTES-Produktion in den Überständen der infizierten, IFN- γ -stimulierten sowie der infizierten und IFN- γ -stimulierten *Hoxb8*-Granulozyten (Abbildung 26 A).

Ähnlich wie für RANTES wurde für MIP-1 α nach 24 h bis 72 h ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der Produktion infolge der Infektion mit *A. phagocytophilum* beobachtet (Abbildung 26 B). Die alleinige Stimulation mit IFN- γ dagegen führte zu keiner signifikanten Induktion der MIP-1 α -Produktion.

Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit *A. phagocytophilum* zu keiner relevanten IL-6-Produktion durch *Hoxb8*-Granulozyten (Abbildung 27 A). Bei gleichzeitiger Infektion und Stimulation mit IFN- γ war jedoch eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Produktion von IL-6 nachweisbar.

Die Infektion mit *A. phagocytophilum* löste in *Hoxb8*-Granulozyten einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg der TNF-Produktion nach 24 h bis 96 h Infektionsdauer aus, der bei gleichzeitiger Stimulation mit IFN- γ deutlicher ausfiel (Abbildung 27 B).

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die zusätzliche IFN- γ -Stimulation infizierter Zellen jeweils zu einem deutlich stärkeren Anstieg der RANTES-, IL-6- und TNF-Produktion führt, die vom Erreger nicht unterdrückt werden kann. Außerdem besteht in vitro ein direkter Effekt von IFN- γ auf das Wachstum von *A. phagocytophilum* in *Hoxb8*-Granulozyten.

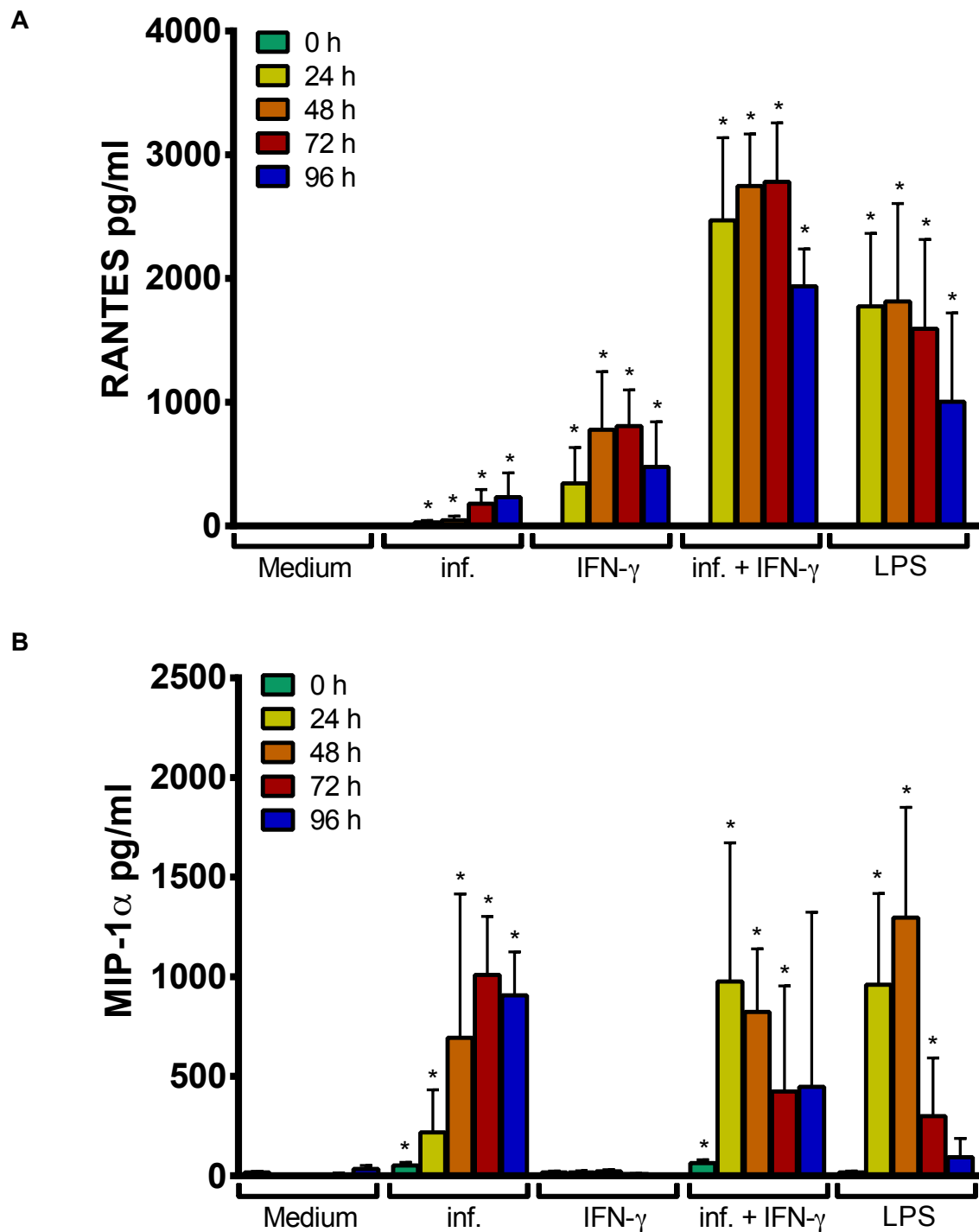


Abbildung 26. Zytokin- bzw. Chemokin-Produktion in uninfizierten (Medium), IFN- γ -stimulierten (40 ng/ml), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten), *A. phagocytophilum*-infizierten und zudem mit IFN- γ stimulierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 200 ng/ml LPS. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Zeit nach Infektion bzw. Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$. **(A)** RANTES. **(B)** MIP-1 α .

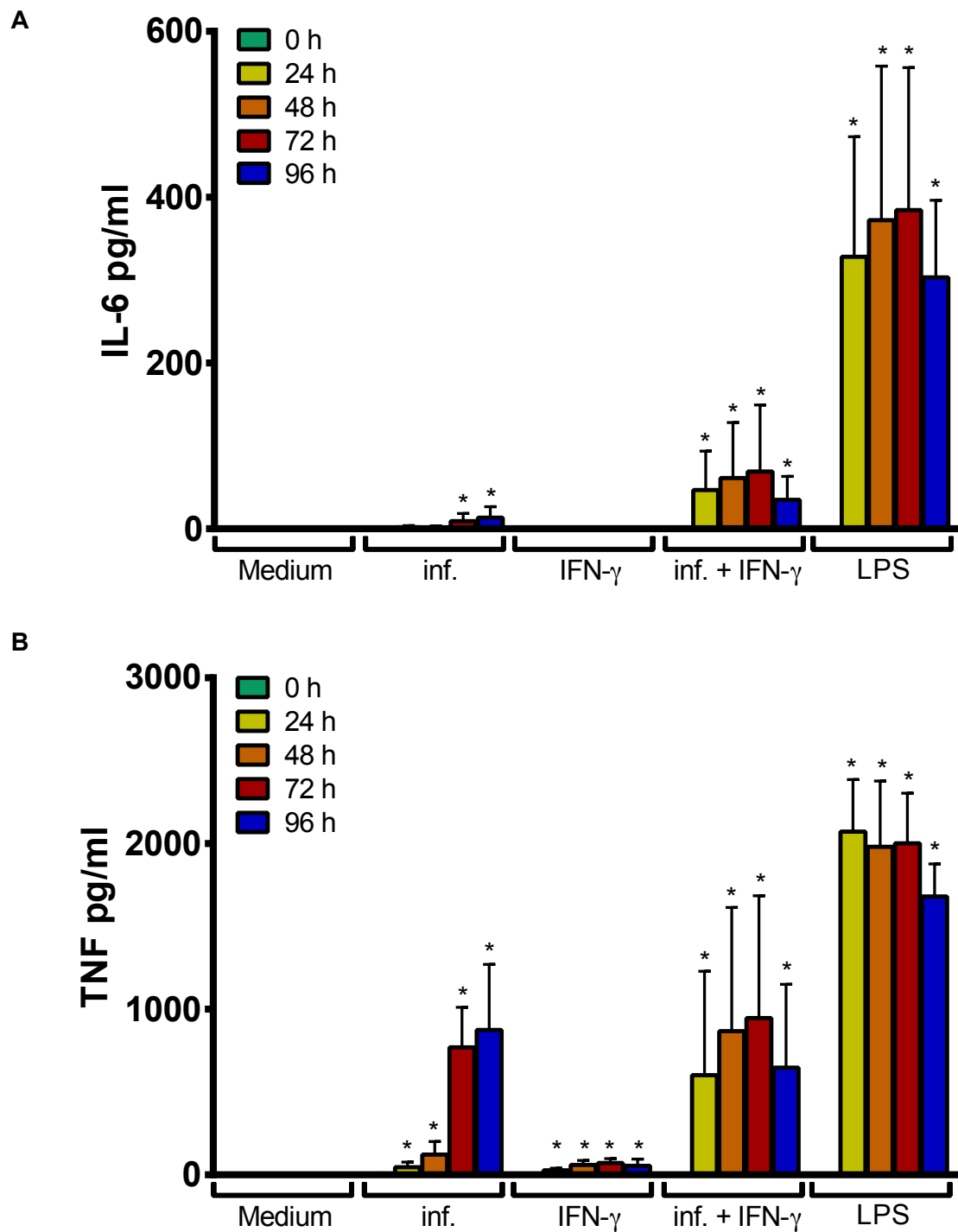


Abbildung 27. Zytokin- bzw. Chemokin-Produktion in uninfizierten (Medium), IFN- γ -stimulierten (40 ng/ml), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten), *A. phagocytophilum*-infizierten und zudem mit IFN- γ stimulierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 200 ng/ml LPS. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Zeit nach Infektion bzw. Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$. **(A)** IL-6. **(B)** TNF.

4.8 Die Spezifität des IFN- γ -abhängigen Mechanismus bei der Wachstumshemmung von *A. phagocytophilum*

Um in dieser Studie zu untersuchen, ob der wachstumshemmende Effekt von IFN- γ auf *A. phagocytophilum* IFN- γ -spezifisch ist, sind *Hoxb8*-Granulozyten mit Defekt für den Interferon- γ -Rezeptor (IFN- γ R) verwendet worden. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die IFN- γ -Wirkung durch das Fehlen des IFN- γ R aufgehoben wurde, da sich keine signifikanten Unterschiede des Wachstums von *A. phagocytophilum* in murinen Wildtyp oder IFN- γ R^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten zeigten (Abbildung 28).

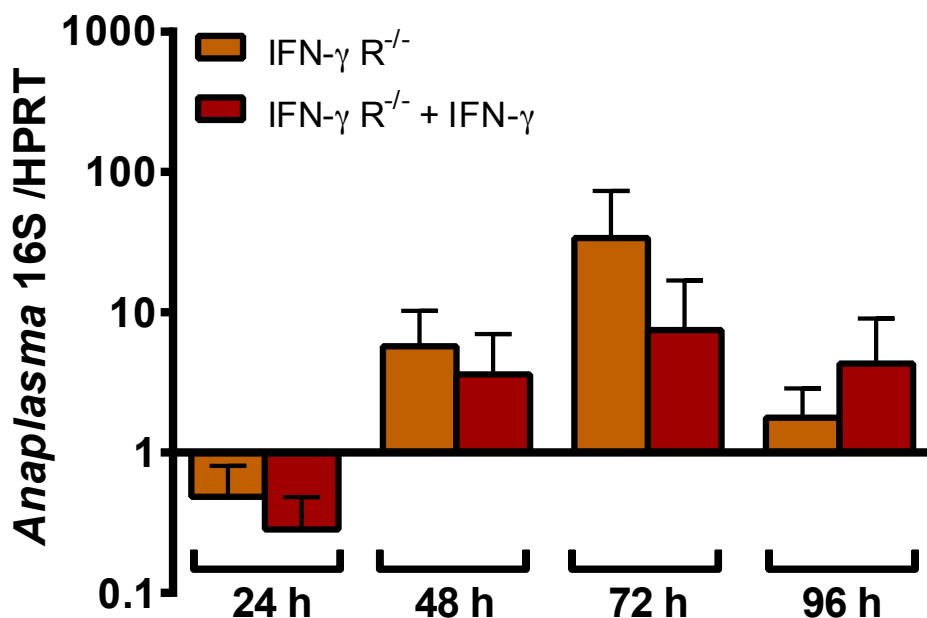


Abbildung 28. Relative Zunahme von *A. phagocytophilum*-spezifischer 16S rRNA, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von unstimulierten und mit IFN- γ (40 ng/ml) stimulierten murinen IFN- γ R^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den jeweiligen 0-h-Wert.

Außerdem wurde wiederum die iNOS-mRNA-Expression ermittelt. Auch hier zeigte sich, dass bei alleiniger Stimulation von IFN- γ R^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten mit IFN- γ keine Induktion von iNOS-mRNA erfolgte (Abbildung 29). Allerdings war die Grund-Expression von iNOS-mRNA in unstimulierten IFN- γ R^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten höher als in Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten.

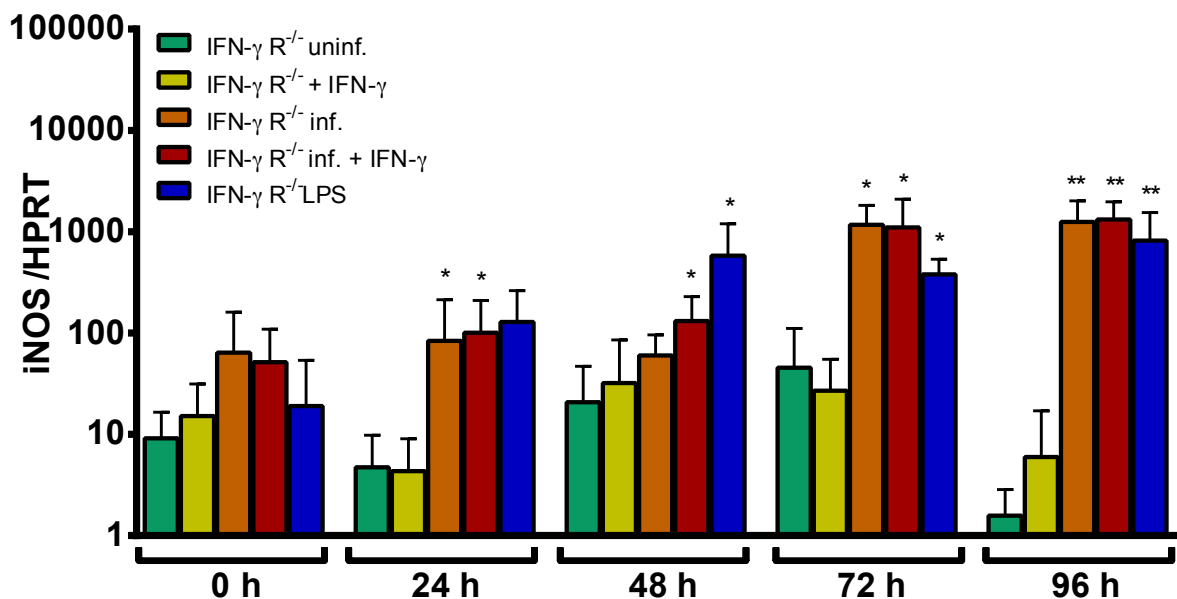


Abbildung 29 Relative iNOS-mRNA-Expression, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in uninf. (uninfizierten), IFN- γ -stimulierten (40 ng/ml), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten), *A. phagocytophilum*-infizierten und zudem mit IFN- γ stimulierten sowie in mit LPS (200 ng/ml) stimulierten murinen IFN- γ R^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den 0-h-Wert der uninfizierten murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten. * = p < 0,05.

Die Zytokinproduktion der IFN- γ R^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten (Abbildung 30 und 31) war vergleichbar mit der Produktion durch Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten (Abbildungen 26 und 27). Eine IFN- γ -Stimulation führte jedoch in IFN- γ R^{-/-} Zellen – wie zu erwarten war – zu keiner Veränderung der Produktion von RANTES, IL-6 und TNF.

Somit ist nachgewiesen, dass eine IFN- γ -Stimulation über einen IFN- γ -spezifischen Effekt zu einem reduzierten Wachstum von *A. phagocytophilum* in *Hoxb8*-Granulozyten führt.

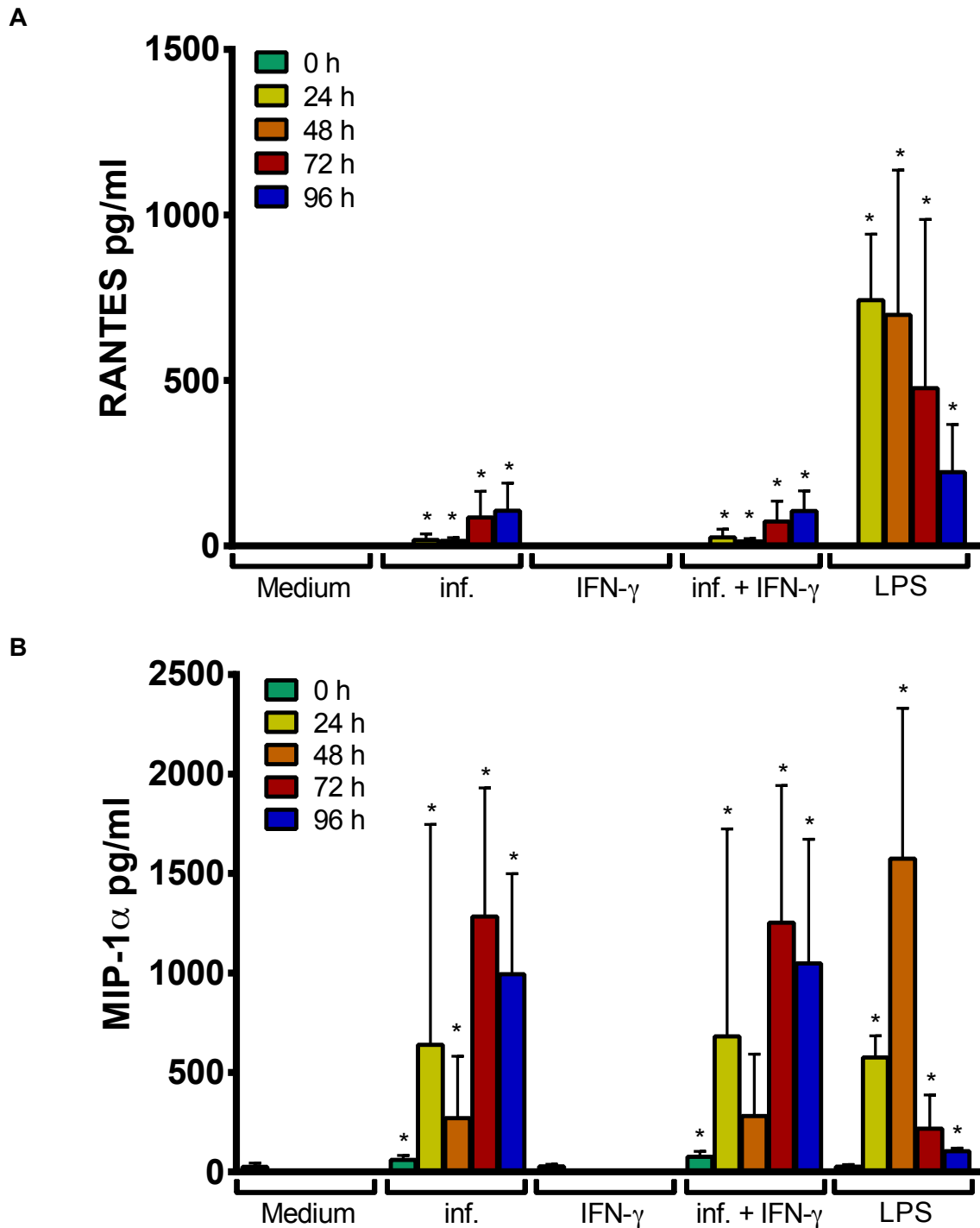


Abbildung 30. Zytokin- bzw. Chemokin-Produktion in uninanzierten (Medium), IFN- γ -stimulierten (40 ng/ml), inf. (*A. phagocytophilum*-inanzierten), *A. phagocytophilum*-inanzierten und zudem mit IFN- γ stimulierten murinen IFN- γ R^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 200 ng/ml LPS. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Zeit nach Infektion bzw. Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus vier unabhangigen Experimenten. * = p < 0,05. **(A)** RANTES. **(B)** MIP-1 α .

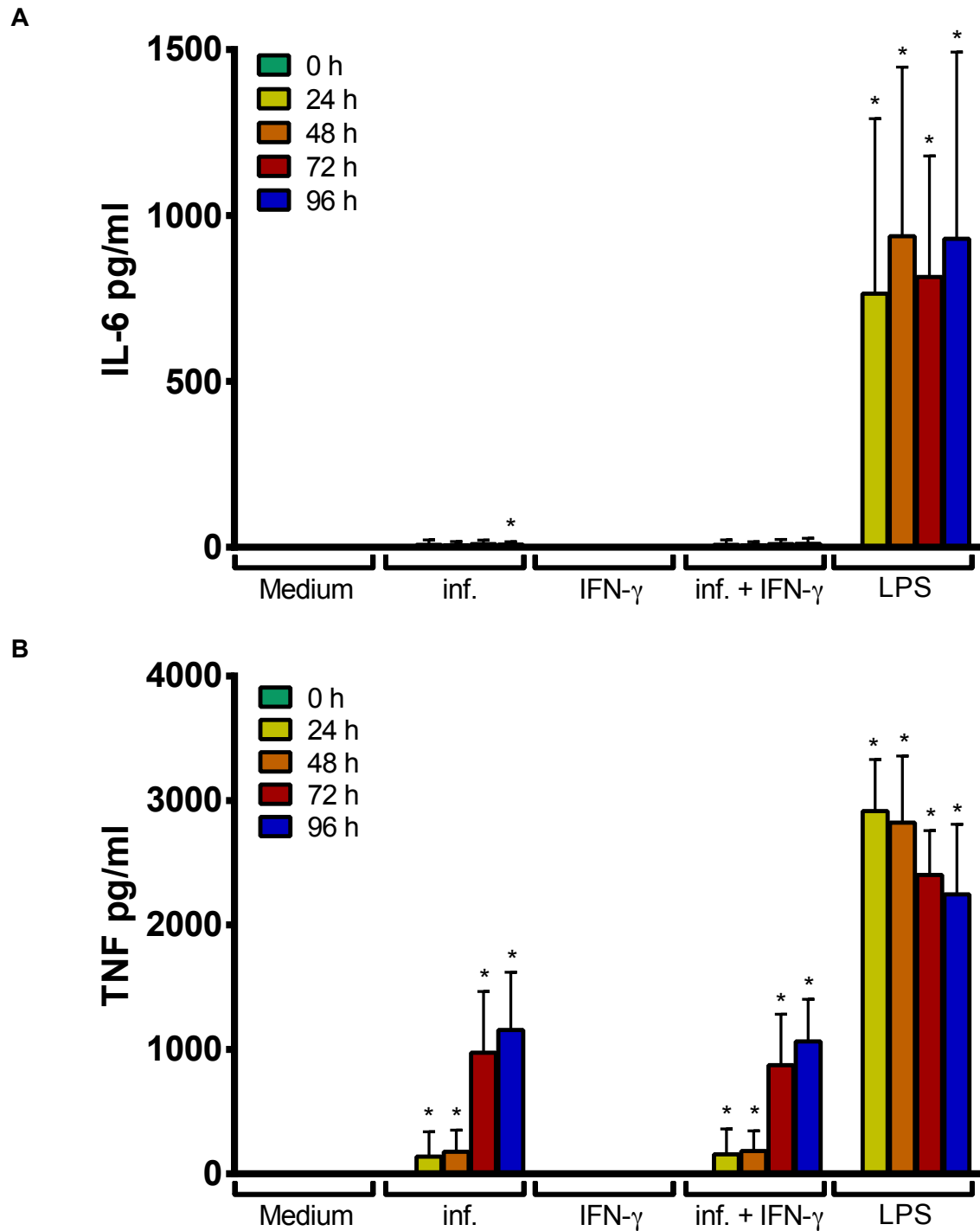


Abbildung 31. Zytokin- bzw. Chemokin-Produktion in uninfizierten (Medium), IFN- γ -stimulierten (40 ng/ml), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten), *A. phagocytophilum*-infizierten und zudem mit IFN- γ stimulierten murinen IFN- γ R^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 200 ng/ml LPS. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Zeit nach Infektion bzw. Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$. **(A)** IL-6. **(B)** TNF.

4.9 Die Bedeutung der iNOS bei der Wachstumshemmung von *A. phagocytophilum* in mit IFN- γ stimulierten murinen *Hoxb8*-Granulozyten

Die Stimulation infizierter *Hoxb8*-Granulozyten mit IFN- γ führte – wie bereits beschrieben – zu einer deutlichen Wachstumshemmung von *A. phagocytophilum*. Des Weiteren kam es durch die IFN- γ -Stimulation zu einer deutlichen Induktion der iNOS-mRNA-Expression. Deshalb war zu untersuchen, ob der wachstumshemmende Effekt von IFN- γ iNOS-abhängig ist. Hierfür wurden infizierte iNOS^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten mit IFN- γ stimuliert. Wie bei den IFN- γ -stimulierten Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten (Abbildung 23) zeigte sich ein signifikant ($p < 0,05$) reduziertes Wachstum von *A. phagocytophilum* nach 48 h bis 96 (Abbildung 32).

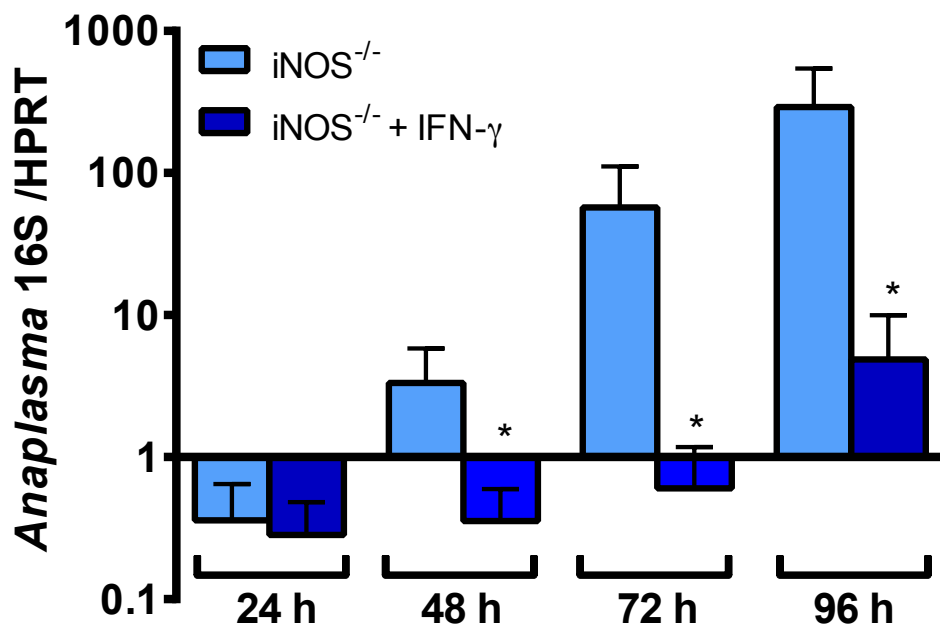


Abbildung 32. Relative Zunahme von *A. phagocytophilum*-spezifischer 16S rRNA, normalisiert auf den mRNA-Gehalt an muriner HPRT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von unstimulierten und mit IFN- γ (40 ng/ml) stimulierten murinen iNOS^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung erfolgte auf den jeweiligen 0-h-Wert. * = $p < 0,05$.

IFN- γ -stimulierte, *A. phagocytophilum*-infizierte murine Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten zeigten in dieser Studie tendenziell eine verstärkte Zytokin- bzw. Chemokin-Produktion im Vergleich zu infizierten, nicht IFN- γ -stimulierten Zellen. Dementsprechend wurden diese ebenso im Überstand der iNOS^{-/-} *Hoxb8*-neutrophilen Granulozyten analysiert.

Im Vergleich zu Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten (Abbildung 26) produzierten iNOS^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten (Abbildung 33 A) nach Infektion mit *A. phagocytophilum* größere Mengen an RANTES. Auch in der Abwesenheit von iNOS war die Stimulierbarkeit durch IFN- γ jedoch erhalten.

Ähnlich wie für RANTES war die IL-6- und TNF-Induktion durch IFN- γ auch in iNOS^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten nachweisbar. Es wurden sogar größere Mengen als in Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gebildet (Abbildung 34 A und B). Im Gegensatz dazu war die Produktion von MIP-1 α mit der in Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten vergleichbar (Abbildung 33 B).

Somit ist der IFN- γ -induzierte Effekt hinsichtlich der Wachstumshemmung von *A. phagocytophilum* iNOS-unabhängig. Zugleich zeigte sich jedoch eine veränderte Zytokinproduktion in Folge der iNOS-Defizienz.

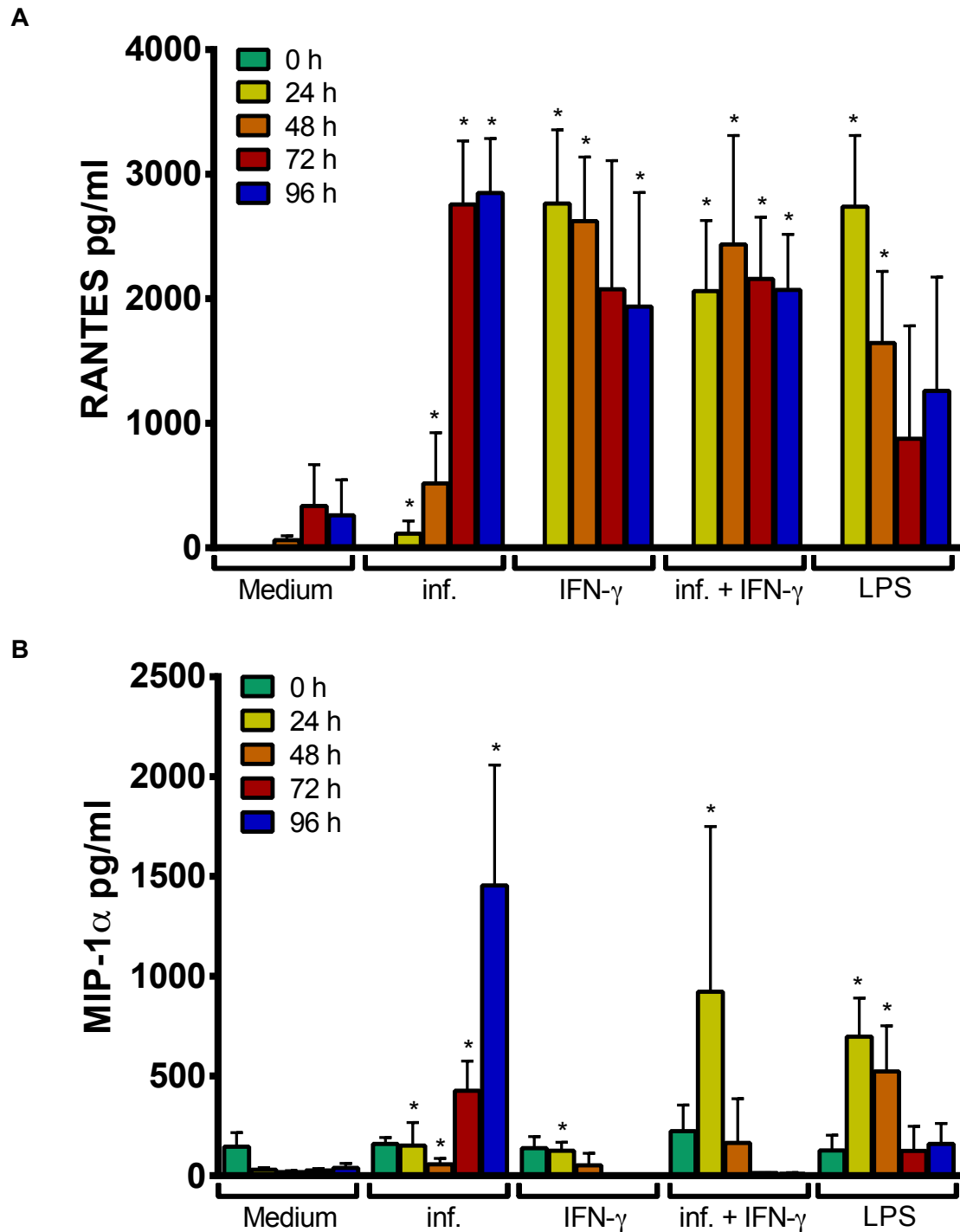


Abbildung 33. Zytokin- bzw. Chemokin-Produktion in uninanzierten (Medium), IFN- γ -stimulierten (40 ng/ml), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten), *A. phagocytophilum*-infizierten und zudem mit IFN- γ stimulierten murinen iNOS^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 200 ng/ml LPS. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Zeit nach Infektion bzw. Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$. (A) RANTES. (B) MIP-1 α .

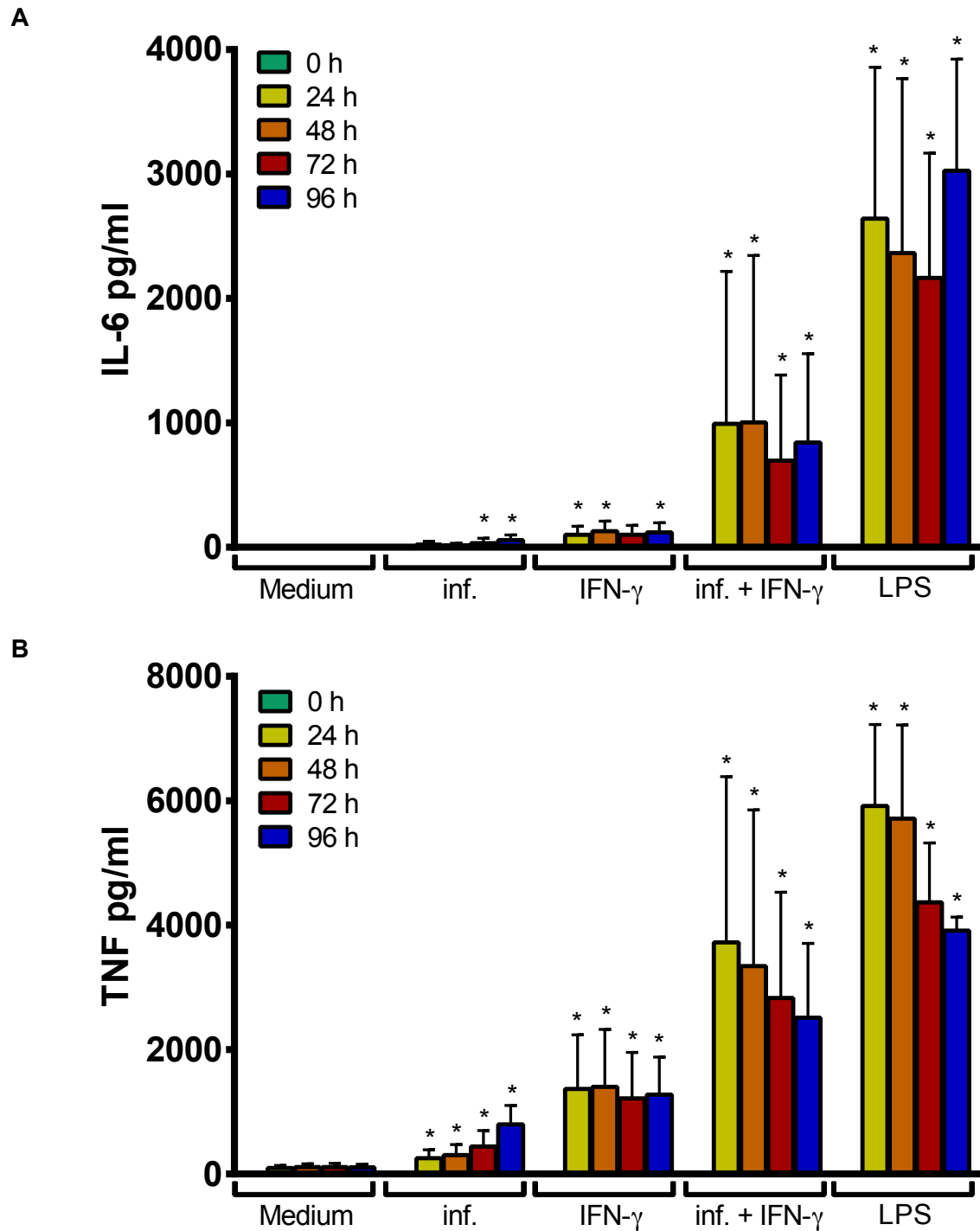


Abbildung 34. Zytokin- bzw. Chemokin-Produktion in uninfizierten (Medium), inf. (*A. phagocytophilum*-infizierten), IFN- γ -stimulierten (40 ng/ml), *A. phagocytophilum*-infizierten und zudem mit IFN- γ stimulierten murinen iNOS^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten. Das Inokulum wurde aus murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten gewonnen. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit 200 ng/ml LPS. Die angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf die Zeit nach Infektion bzw. Stimulation. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$. **(A)** IL-6. **(B)** TNF.

5 Diskussion

Anhand dieser Arbeit lässt sich nachweisen, dass *A. phagocytophilum* in der Lage ist, in murinen *Hoxb8*-Granulozyten zu replizieren, was – wie bereits gezeigt – deren Ähnlichkeit mit primären Neutrophilen nahelegt [194]. Ob das Inokulum aus murinen *Hoxb8*-Granulozyten oder aus humanen HL60-Zellen gewonnen wurde, hat in vitro keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf. Dieser Frage nachzugehen, ist insofern von Interesse gewesen, da ein deutlicher Wirtstropismus innerhalb der Spezies *A. phagocytophilum* besteht [58]. Die von Menschen, Pferden, Rindern und Schafen isolierten Stämme haben in vivo in heterologen Wirtsspezies eine unterschiedliche Pathogenität gezeigt und waren zum Teil nicht in der Lage, in diesen eine klinisch apparente Infektion hervorzurufen [6, 59-64]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass *A. phagocytophilum*-Stämme vom Menschen und vom Nager zumindest genotypisch nicht-homolog sind [50].

Ebenfalls weisen Zellkulturmodelle darauf hin, dass die Spezies-Herkunft der Zelllinie Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *A. phagocytophilum* hat. Demnach führt die Infektion humaner HL60-Zellen und ISE6 Zecken-Zellen beispielsweise zu einer deutlich unterschiedlichen Transkription einer Vielzahl von Genen von *A. phagocytophilum* [201]. Darunter waren insbesondere auch Bestandteile des Typ-IV-Sekretionssystems von *A. phagocytophilum* sowie Oberflächen-assoziierte Proteine wie das „major surface protein-2“ (Msp2). Zugleich wurde von einer anderen Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass die Transkription des *msp2/p44*-Gens temperaturabhängig ist und durch das unterschiedliche Milieu in Zecken-Zellen und humanen HL60-Zellen beeinflusst wird [202]. Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass die mRNA-Expression des für die „dense-core“ Form spezifischen Proteins APH_1235 in der Speicheldrüse infizierter Zecken im Vergleich zu HL60-Zellen in vitro und in Mäusen in vivo deutlich hochreguliert ist [103].

Hingegen zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Anzucht eines humanen *A. phagocytophilum*-Stammes in humanen HL60-Zellen oder in murinen *Hoxb8*-Granulozyten keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf in murinen *Hoxb8*-Granulozyten hat. Eine Veränderung hinsichtlich der Transkription unterschiedlicher Gene von *A. phagocytophilum* in HL60-Zellen und *Hoxb8*-Granulozyten ist zwar nicht auszuschließen, hat jedoch nach den vorliegenden Ergebnissen keinen Einfluss auf die Infektiosität und Replikation in murinen *Hoxb8*-Granulozyten. Vermutlich sind die Unterschiede zwischen Säuger-Zellen und Zecken-Zellen deutlich ausgeprägter. Mit dieser Annahme ließen sich die hier beschriebenen Unterschiede im Wachstumsverhalten erklären.

Um auszuschließen, dass größere Mengen an extrazellulär verbleibenden Erregern den Infektionsverlauf beeinflussen könnten, sind die Zellen nach 4 h gewaschen worden, um

bisher nicht-invasive Bakterien zu entfernen. Dabei zeigte sich nach 4 h eine stärkere Erregerabnahme in den gewaschenen Zellen als in ungewaschenen. Der Waschschritt hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Wachstumskinetik nach 72 h bis 96 h. Dies legt nahe, dass der größte Teil der Bakterien bereits nach 4 h invasiv ist, und bestätigt somit früher gemachte Beobachtungen [158].

Es wird vermutet, dass proinflammatorische Zytokine und Chemokine an der Pathogenese der *A. phagocytophilum*-Infektion beteiligt sind [92]. Durch welche Zelltypen diese produziert werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Da in diesem Zusammenhang die Bedeutung neutrophiler Granulozyten als Produzenten diskutiert wird [53], ist in der vorliegenden Studie untersucht worden, ob die Infektion von murinen *Hoxb8*-Granulozyten mit *A. phagocytophilum* zur Produktion ausgewählter Zytokine und Chemokine führen könne. Nach Infektion von *Hoxb8*-Granulozyten mit *A. phagocytophilum* sind keine messbaren Konzentrationen von Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin(IL)-1 β , IL-12/IL-23, IL-17A, „keratinocyte-derived chemokine“ (KC) und „monokine induced by IFN- γ “ (MIG) detektiert worden. Während IL-6 kaum produziert worden ist, sind jedoch relevante Mengen an „regulated on activation, normal T cell expressed and secreted“ (RANTES), „macrophage inflammatory protein-1 α “ (MIP-1 α) und Tumornekrosefaktor (TNF) nachweisbar. Im Gegensatz dazu ergaben früheren Studien, dass HL60-Zellen nach Infektion mit *A. phagocytophilum* zwar RANTES und MIP-1 α , nicht jedoch TNF sezernierten [174]. Humane Leukozyten wiederum produzierten IL-6 und TNF [175]. Der diskrepante Befund bezüglich des TNF-Nachweises zwischen HL60-Zellen einerseits und der *Hoxb8*-Granulozyten und humanen Leukozyten andererseits könnte darauf zurückzuführen sein, dass die HL60-Zelllinie nicht die Situation in primären Zellen widerspiegelt. Auch in vivo wurden erhöhte TNF-Spiegel im Plasma *A. phagocytophilum*-infizierter Mäuse nachgewiesen [152, 181], ohne dass gezeigt worden wäre, welcher Zelltyp für die Produktion verantwortlich war. Leukozyten, isoliert von mit *A. phagocytophilum*-infizierten Pferden, zeigten ebenfalls eine verstärkte TNF-mRNA-Expression [203].

MIP-1 α ist in der Lage, die Proliferation von Knochenmarks-Vorläuferzellen negativ zu beeinflussen, und verursacht somit vermutlich Veränderung der Hämatopoese [204]. Demnach könnte von neutrophilen Granulozyten produziertes MIP-1 α an der Entstehung der ätiologisch noch ungeklärten Zytopenie im Rahmen einer granulozytären Anaplasiose beteiligt sein. MIP-1 α und RANTES induzieren unter anderem die Rekrutierung von Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), Makrophagen und T-Zellen [205-208]. Die Aktivierung weiterer Immunzellen trägt vermutlich zur immunologischen Kontrolle von *A. phagocytophilum* bei, zumal gezeigt worden ist, dass von NK-Zellen gebildetes IFN- γ sowie T-Zellen in vivo für die Erregerkontrolle notwendig sind [152].

In Leukozyten, die von mit *A. phagocytophilum* infizierten Pferden isoliert waren, ließ sich eine mRNA-Expression von IL-6 nicht nachweisen [203]. In-vitro-Analysen humaner Leukozyten hatten gezeigt, dass für die IL-6 mRNA-Induktion eine deutlich höhere Konzentration an *A. phagocytophilum* benötigt wurde als beispielsweise für die von TNF [175]. Die experimentell infizierten Pferde entwickelten einen eher milden Krankheitsverlauf, der von einer niedrigen Erregerlast im Blut begleitet war [203]. Möglicherweise war deshalb keine IL-6 mRNA nachweisbar. In vitro wurde im Überstand infizierter HL60-Zellen kein IL-6 nachgewiesen [174]. Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben, dass nach Infektion von murinen *Hoxb8*-Granulozyten nur geringe Mengen an IL-6 produziert werden. Möglich ist, dass die Infektionsdosis für eine stärkere IL-6 Induktion nicht ausreichend gewesen ist oder dass die Produktion in vivo durch andere Leukozyten-Subtypen erfolgt.

Nachweislich sezernieren humane neutrophile Granulozyten als Folge einer *A. phagocytophilum*-Infektion IL-8 [131, 173]. Dieses Zytokin ist wesentlich für die Rekrutierung weiterer neutrophiler Granulozyten verantwortlich [139], die als potentielle Wirtszellen für *A. phagocytophilum* dienen können. Bei In-vivo-Versuchen mit Mäusen ist zu berücksichtigen, dass bisher kein direktes murines Homolog für das humane IL-8 identifiziert worden ist. Vermutlich agieren unter anderem KC und MIP-2 als funktionelle Homologe und binden an entsprechende CXCR2-Rezeptoren [209]. CXCR2-defiziente Mäuse sind weniger empfänglich gegenüber einer *A. phagocytophilum*-Infektion, und die Migration neutrophiler Granulozyten ist deutlich reduziert [173]. Die charakteristischen histopathologischen Veränderungen sind jedoch von der CXCR2-Defizienz unbeeinflusst [210].

Wie die vorliegende Studie zeigt, produzieren murine *Hoxb8*-Granulozyten nach Infektion mit *A. phagocytophilum* kein KC. Demnach könnten andere Chemokine wie beispielsweise MIP-2 für die Rekrutierung muriner neutrophiler Granulozyten im Rahmen der *A. phagocytophilum*-Infektion verantwortlich sein. Beispielsweise bildeten murine Milzzellen nach Stimulation mit *A. phagocytophilum* KC und MIP-2 [180]; doch könnten – zumal Gesamt-Milzzellen verwendet worden sind – für diese Produktion auch anderen Zelltypen verantwortlich sein.

Das ebenfalls der CXC-Chemokin-Familie zugehörige MIG wird von neutrophilen Granulozyten sezerniert [211]. In vitro zeigte sich jedoch, dass für die Produktion von MIG durch humane neutrophile Granulozyten eine Kostimulation mit IFN- γ sowie Lipopolysaccharid (LPS) oder TNF- α notwendig ist [212]. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen für dieses Chemokin eine ausbleibende Produktion sowohl nach Infektion als auch nach LPS-Stimulation. Die genannte Kombination aus IFN- γ sowie LPS oder TNF- α sind im Rahmen

dieser Studie allerdings nicht getestet worden. Möglicherweise war auch die hier eingesetzte LPS-Konzentration (10 ng/ml) zu gering, um eine ausreichende Stimulation zu erreichen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass murine *Hoxb8*-Granulozyten weder nach Infektion mit *A. phagocytophilum* noch nach LPS-Stimulation IL-1 β produzieren. IL-1 β mRNA wurde jedoch in humanen Neutrophilen [175, 213] und equinen Leukozyten [203] nach Stimulation mit *A. phagocytophilum* nachgewiesen. Es wurde allerdings in einer anderen Studie beobachtet, dass die IL-1 β -Synthese in Monozyten durch zwei unabhängige Mechanismen auf Ebene der Transkription und Translation reguliert und bei zu geringer Stimulation zwar die mRNA exprimiert wurde, eine IL-1 β -Proteinsynthese aber ausblieb [214]. Dies könnte ebenfalls auf die IL-1 β Produktion durch neutrophile Granulozyten zutreffen.

Für die Replikation von *A. phagocytophilum* sind neutrophile Granulozyten zwingend notwendig [152]. Diese besitzen eine Vielzahl von antimikrobiellen Effektormechanismen wie beispielsweise Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat(NADPH)-Oxidase, induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und Myeloperoxidase (MPO) [150, 164]. Insbesondere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) spielen eine entscheidende Rolle bei der Elimination verschiedener intrazellulärer Erreger [168, 215]. Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass Mäuse mit Defekten für diese Effektormechanismen den Erreger ähnlich effizient wie Wildtypmäuse eliminieren [107, 152]. Eine andere Arbeitsgruppe hatte zuvor allerdings unter Verwendung einer nicht-quantitativen PCR ähnliche In-vivo-Untersuchungen durchgeführt und eine verzögerte Erregerelimination in iNOS^{-/-}-Mäusen festgestellt [216]. Anhand der für die vorliegende Studie durchgeführten In-vitro-Experimente lässt sich nachweisen, dass der Infektionsverlauf in murinen gp91^{phox}^{-/-}, iNOS^{-/-} und MPO^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten mit dem in murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten vergleichbar ist. Demnach sind die genannten Effektormechanismen der angeborenen Immunität für eine direkte Kontrolle von *A. phagocytophilum* nicht notwendig, werden aber möglicherweise durch den Erreger auf noch ungeklärte Weise umgangen bzw. manipuliert.

Eine Reihe von Mikroorganismen ist in der Lage, die Produktion von ROS durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen aktiv zu unterdrücken [217-220]. Ihre Generierung wird hauptsächlich durch den aktivierbaren NADPH-Oxidase-Enzymkomplex ermöglicht [153]. Es wurde berichtet, dass *A. phagocytophilum* die Bildung von ROS in HL60-Zellen sowie in humanen und murinen neutrophilen Granulozyten unterdrückt [155-158]. Überdies wurde gezeigt, dass der an die Wirtszelle gebundene, noch nicht invasive Erreger in der Lage ist, die ROS-Produktion humaner neutrophiler Granulozyten infolge der Stimulation mit *Escherichia coli*, Phorbol-Myristat-Acetat oder Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin zu minimieren [156]. Andere Arbeitsgruppen hingegen beschrieben die Aktivierung der NADPH-Oxidase in

der frühen Phase der Infektion [221]. Des Weiteren wurde eine Aktivierung der Zusammenlagerung der Cytochrom-b558-Untereinheiten an der Plasmamembran humaner neutrophiler Granulozyten infolge einer *A. phagocytophilum*-Infektion gezeigt [158]. Es wurde deshalb vermutet, dass der Erreger in der Lage sei, ROS zu entgiften [159, 160]. Nach erfolgreicher Invasion kann sich *A. phagocytophilum* vermutlich ungestört in seiner Vakuole vermehren, da deren phagosomale Membran von der Abwesenheit der Untereinheiten der NADPH-Oxidase wie gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} und Rac2 gekennzeichnet ist [158, 159, 222].

Hinsichtlich der Regulation der Transkription von einzelnen Komponenten der NADPH-Oxidase wurden ebenfalls gegensätzliche Ergebnisse erzielt. Beschrieben wurde die Herunterregulation der mRNA-Expression von gp91^{phox} und *rac2* in HL60-Zellen sowie in neutrophilen Granulozyten, wobei teilweise nicht-quantitative Methoden angewandt wurden [155, 160, 161]. Verschiedene, der reduzierten Genexpression zugrunde liegende Mechanismen wurden diskutiert. Eine Arbeitsgruppe vermutete, dass ankA an den gp91^{phox} Promotor binden und dadurch eine Veränderung der Gen-Expression hervorrufen könne [160]. Thomas et. al wiederum beschrieben die erhöhte Bindung des Repressors „CCAAT displacement protein“ (CDP) am Promoter des gp91^{phox}-Gens in HL60-Zellen [162]. Eine Microarray-Analyse humaner neutrophiler Granulozyten hat hingegen keine wesentlichen Veränderungen der Expression der Gene ergeben, die für die Komponenten der NADPH-Oxidase kodieren. Insbesondere die Expression von gp91^{phox} blieb über einen Zeitraum von 24 h unverändert [134]. Frühere Untersuchungen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Freiburg im Breisgau ergaben keine transkriptionelle Regulation der gp91^{phox}-mRNA-Expression in ex vivo gewonnener Milz und Lunge infizierter Mäuse [152]. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann ebenfalls keine Induktion oder Herunterregulation der Expression von gp91^{phox} in infizierten murinen *Hoxb8*-Granulozyten festgestellt werden. Erstaunlicherweise hatte die Stimulation mit 10 ng/ml LPS ebenfalls keinen wesentlichen Einfluss auf die gp91^{phox}-Expression. Northern Blot-Analysen beschrieben nämlich eine Induktion der gp91^{phox} mRNA in humanen neutrophilen Granulozyten durch LPS [223]. Die dabei eingesetzte Konzentration an LPS von 1 µg/ml war jedoch deutlich höher als in den Versuchen dieser Studie. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie vermuten, dass die NADPH-Oxidase muriner neutrophiler Granulozyten keinen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum von *A. phagocytophilum* hat. Die Bildung von ROS hat sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersuchen lassen. In weiteren Studien sollte daher analysiert werden, ob die Infektion von *Hoxb8*-Granulozyten mit *A. phagocytophilum* zur Bildung extra- und intrazellulärer ROS führt.

Die iNOS ist ebenfalls an der Kontrolle intrazellulärer Erreger beteiligt [224]. Diese Mikroorganismen entwickelten unterschiedliche Strategien, um die iNOS-Expression oder Enzymaktivität zu inhibieren sowie RNS zu entgiften [224]. Eine Aktivierung der iNOS durch unterschiedliche Stimuli führt in Anwesenheit von L-Arginin zu einer verstärkten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) [224]. Da sowohl ein direkter als auch ein indirekter Nachweis von NO sehr aufwendig ist, etablierte sich der Nachweis des stabilen Metaboliten Nitrit als Maß für die iNOS-Aktivität [225]. Die in dieser Studie vorgelegten Ergebnisse zeigen eine deutliche Hochregulation der iNOS-mRNA-Expression in Folge einer Infektion mit *A. phagocytophilum* in murinen *Hoxb8*-Granulozyten, jedoch keinen signifikanten Nachweis von Nitrit in den jeweiligen Zellkultur-Überständen. Eine Ursache hierfür liegt eventuell an der geringen Sensitivität des hier eingesetzten Griess-Assays [226]. Eine Entgiftung von RNS durch *A. phagocytophilum* sowie eine ausbleibende finale Aktivierung der iNOS können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Weitere Untersuchungen dieser Arbeit belegen, dass eine $gp91^{phox}$ - und MPO-Defizienz zu einer vermutlich kompensatorischen Hochregulation der iNOS-mRNA-Expression führt. Einen ähnlichen Effekt zeigten interessanterweise frühere Studien, in welchen $MPO^{-/-}$ -Mäuse infolge einer Infektion mit *E. coli* eine kompensatorische Hochregulation der iNOS-Expression und NO-Produktion aufwiesen [227]. Zusätzlich war in murinen $gp91^{phox^{-/-}}$ *Hoxb8*-Granulozyten im Gegensatz zu murinen Wildtyp *Hoxb8*-Granulozyten eine geringgradige Nitritproduktion nachweisbar. Um abzuklären, inwieweit *A. phagocytophilum* Strategien entwickelt hat, um den RNS zu entkommen, sind weitere Analysen hinsichtlich der Aktivität der iNOS sowie der Synthese von NO erforderlich.

Wie die NADPH-Oxidase und iNOS ist die MPO ein wichtiger Effektormechanismus neutrophiler Granulozyten [167]. Die Effektivität der antimikrobiellen Wirkung dieses Enzymes in vivo wird jedoch sehr unterschiedlich beschrieben [169]. Es gibt einige Fallberichte über schwerwiegende Pilzinfektionen und rezidivierende Infektionen im Zusammenhang mit einer MPO-Defizienz. Dennoch scheinen die meisten Menschen mit MPO-Mangel nicht wesentlich anfälliger gegenüber Infektionserkrankungen zu sein [228-230]. In-vitro-Studien mit humanen $MPO^{-/-}$ Neutrophilen beschrieben eine deutliche Beeinträchtigung der Erregerelimination von *S. aureus* und anderen Mikroorganismen [231-233]. $MPO^{-/-}$ -Mäuse zeigten hingegen eine ungestörte Erregerelimination von *S. aureus*, waren jedoch empfänglicher gegenüber einer Infektion mit *Candida albicans* [234]. Anhand der Untersuchungen dieser Arbeit lässt sich nachweisen, dass in vitro das Wachstum von *A. phagocytophilum* in *Hoxb8*-Granulozyten von der Abwesenheit der MPO unabhängig ist. Dies wird durch In-vivo-Beobachtungen im Mausmodell unterstützt [152]. Der Mangel an iNOS bzw. $gp91^{phox}$ führte – ähnlich wie für iNOS gezeigt – zu einer kompensatorischen Hochregulation der MPO-mRNA-Expression in

Hoxb8-Granulozyten. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die in der vorliegenden Studie untersuchten antimikrobiellen Effektormoleküle muriner *Hoxb8*-Granulozyten zwar nicht an der direkten Kontrolle einer Infektion mit *A. phagocytophilum* beteiligt sind; doch ist der Nachweis gelungen, dass ein Fehlen dieser antimikrobiell wirksamen Effektormechanismen zu einer kompensatorischen Hochregulation anderer Effektoren führt.

A. phagocytophilum ist in der Lage, primäre Knochenmarksvorläuferzellen der granulocytären und monozytären Zellreihe zu infizieren [235]. Jedoch ist gezeigt worden, dass eine zunehmende monozytäre Differenzierung zu einer verstärkten Resistenz gegenüber dem Erreger führt [121]. Vermutet wurde, dass dies an der reduzierten Expression von Sialyl Lewis x, einem wichtigen Rezeptor für *A. phagocytophilum*, liegen könnte. Neben der reduzierten Bindung an monozytär differenzierten Zellen kommen jedoch auch eine Wachstumshemmung oder eine aktive Abtötung des intrazellulären Erregers in Frage [121]. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen hingegen, dass murine *Hoxb8*-Makrophagen die Replikation von *A. phagocytophilum* nicht unterstützen. Eine Zytokin- und Chemokin-Produktion infolge der Stimulation mit *A. phagocytophilum* blieb im Gegensatz zu *Hoxb8*-Granulozyten ebenfalls aus. Doch die deutliche Induktion der Zytokin- und Chemokin-Produktion durch Stimulation mit LPS zeigt, dass murine *Hoxb8*-Makrophagen prinzipiell in der Lage sind, diese zu produzieren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass monozytäre Zellen *A. phagocytophilum* nicht erkennen und daher nicht durch den Erreger stimuliert werden. Derzeit werden weitere Analysen durchgeführt, um zu untersuchen, ob das Fehlen entsprechender Oberflächenrezeptoren der Makrophagen eine Bindung von *A. phagocytophilum* an diese Zellen verhindert.

Zu den antimikrobiellen Effektormechanismen von Makrophagen zählen – wie bei neutrophilen Granulozyten – insbesondere ROS und RNS [236, 237]. Eine Reihe intrazellulärer Erreger nutzt Makrophagen als Wirtszellen und hat Strategien entwickelt, um deren Abwehrmechanismen zu entkommen [238]. Mykobakterien beispielsweise entgehen durch Makrophagen gebildeten ROS [239] und scheinen erstaunlicherweise RNS für ihr intrazelluläres Überleben zu nutzen [240]. *Leishmania spp.* sind zwar in der Lage, die ROS-Produktion ihrer Wirtszellen, der Makrophagen, zu hemmen, jedoch scheinen RNS einen wesentlichen Beitrag bei der Erregerelimination zu leisten [220, 241]. Andererseits inhibieren Makrophagen die intrazelluläre Replikation von *Salmonella Typhimurium* durch die Aktivierung sowohl der NADPH-Oxidase als auch der iNOS [242]. Dies ließ vermuten, dass Makrophagen diese Effektormechanismen nutzen könnten, um das Wachstum von *A. phagocytophilum* zu behindern. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass trotz Fehlens von gp91^{phox}, iNOS und MPO eine Replikation des Erregers in Makrophagen nicht möglich ist. Ebenso sind die Induktion von iNOS und die Produktion von Nitrit in mit *A.*

phagocytophilum infizierten *Hoxb8*-Makrophagen ausgeblieben. Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass Makrophagen als Wirtszellen von *A. phagocytophilum* eher nicht in Frage kommen. Da eine Replikation auch in Abwesenheit wichtiger Effektormechanismen nicht möglich gewesen ist und *Hoxb8*-Makrophagen durch *A. phagocytophilum* nicht aktiviert worden sind, wird der Erreger wahrscheinlich aufgrund fehlender Rezeptoren von Makrophagen nicht erkannt.

IFN- γ ist ein wichtiger Modulator der Funktion neutrophiler Granulozyten [199]. Eine Infektion mit *A. phagocytophilum* führt bei Menschen zu erhöhten Serumspiegeln dieses Zytokins [243]. Ähnliches wurde auch bereits im Mausmodell beobachtet [152, 180, 181]. IFN- γ -defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte bakterielle Beladung in der Frühphase der Infektion [180, 182, 184], während die finale Erregerelimination unbeeinträchtigt war [152]. Bei der Infektion mit *A. phagocytophilum* sind vermutlich NK-Zellen die Hauptproduzenten von IFN- γ , da eine In-vivo-Depletion von NK-Zellen zu einer erhöhten bakteriellen Beladung geführt hat, die mit der in IFN- $\gamma^{-/-}$ -Mäusen vergleichbar gewesen ist [152]. Kürzlich ist gezeigt worden, dass neutrophile Granulozyten im Rahmen einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* IFN- γ produzieren können [244]. Die Infektion von *Hoxb8*-Granulozyten mit *A. phagocytophilum* führte jedoch zu keiner messbaren Sezernation von IFN- γ .

Für die immunologische Kontrolle einiger intrazellulärer Erreger wie Mykobakterien und *Leishmania spp.* ist IFN- γ für die Aktivierung von antimikrobiellen Effektormechanismen der Makrophagen wichtig [245, 246]. Um das intrazelluläre Überleben zu verbessern, entwickelten die Erreger unterschiedliche Mechanismen zur Manipulation der IFN- γ -Signalkaskade [247-250]. Die Infektion humaner neutrophiler Granulozyten mit *A. phagocytophilum* führte zur reduzierten Expression der Interferon- γ Rezeptor(IFN- γ R)-alpha-Kette an der Zelloberfläche, zur herabgesetzten IFN- γ -abhängigen STAT1(signal transducer and activator of transcription 1)-Phosphorylierung sowie zur verstärkten mRNA-Expression von SOCS1 und SOCS3 [251]. Bei SOCS1 und SOCS3 handelt es sich um Proteine, die an einem negativen Feedback-Mechanismus beteiligt sind, um IFN- γ -abhängige Entzündungsreaktionen zu limitieren [252]. Zusätzlich führte die Infektion der humanen neutrophilen Granulozyten zu einer reduzierten Produktion der IFN- γ -induzierbaren Chemokinen IP-10 (interferon gamma-induced protein 10) und MIG [251]. Die zugrundeliegenden Mechanismen, durch welche *A. phagocytophilum* die IFN- γ -Signalkaskade manipuliert, sind jedoch noch unbekannt. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich jedoch zeigen, dass eine direkte IFN- γ -Stimulation von murinen *Hoxb8*-Granulozyten zu einer deutlichen Wachstumsreduktion von *A. phagocytophilum* führt. Demnach scheint IFN- γ die *Hoxb8*-Granulozyten zu aktivieren und verhindert somit eine ungestörte Vermehrung des Erregers. Zwar wurde kürzlich eine IFN- γ -abhängige verstärkte mRNA-Expression von gp91^{phox} und p47^{phox} in murinen neutrophilen

Granulozyten beschrieben, nachdem diese mit 150 U/ml IFN- γ inkubiert worden waren [253]. Doch mit der vorliegenden Studie lässt sich weder in uninfizierten noch in infizierten IFN- γ -stimulierten *Hoxb8*-Granulozyten eine Induktion der gp91^{phox}-mRNA-Expression nachweisen. Diese konträren Ergebnisse bezüglich der gp91^{phox}-mRNA-Expression könnten eventuell an dem geringeren Reinheitsgrad der ex vivo gewonnenen murinen Granulozyten liegen. Diese Studie bekräftigt jedoch frühere Ergebnisse einer Arbeitsgruppe, welche ebenfalls keinen Effekt von IFN- γ auf den „respiratory burst“ in bovinen Granulozyten nachgewiesen hat [254].

Eine Stimulation mit IL-1, TNF und IFN- γ führte in humanen neutrophilen Granulozyten zu einer iNOS-Induktion [255]. Ähnliches wurde für aus Ratten gewonnenen Granulozyten beobachtet [256, 257]. Im Rahmen dieser Studie ist nun überdies in murinen *Hoxb8*-Granulozyten eine deutliche Induktion der iNOS-mRNA-Expression durch eine IFN- γ -Stimulation beobachtet worden, welche infolge gleichzeitiger Infektion mit *A. phagocytophilum* nicht unterdrückbar gewesen ist. Diese Beobachtungen ließen zunächst vermuten, dass eventuell iNOS an der Replikationshemmung von *A. phagocytophilum* beteiligt sei. Es hat sich jedoch gezeigt, dass eine IFN- γ -Stimulation von iNOS^{-/-} *Hoxb8*-Granulozyten ebenfalls zu einer deutlichen Wachstumsreduktion von *A. phagocytophilum* führt. Die IFN- γ -abhängige Wachstumshemmung ist in den IFN- γ R-defizienten Zellen jedoch ausgeblieben. Demnach scheint der wachstumshemmende Effekt IFN- γ -spezifisch, jedoch iNOS-unabhängig zu sein.

Die Untersuchungen dieser Studie haben erstmals gezeigt, dass eine IFN- γ -Stimulation infizierter Granulozyten zu einer signifikanten Wachstumshemmung von *A. phagocytophilum* führt. In murinen neutrophilen Granulozyten scheint demnach die beschriebene, vom Erreger ausgelöste Hemmung der IFN- γ -Signalkaskade [251] diesem jedoch nicht auszureichen, um dem direkten IFN- γ -Effekt zu entkommen. Zudem zeigt diese Arbeit, dass dieser Effekt iNOS-unabhängig ist. Der zugrundeliegende exakte Mechanismus dieser IFN- γ -spezifischen Wachstumshemmung sollte in weiteren Studien analysiert werden.

6 Zusammenfassung

Immunologische Kontrolle von *Anaplasma phagocytophilum* durch murine neutrophile Granulozyten

Anaplasma phagocytophilum ist ein durch Zecken übertragenes obligat intrazelluläres Gram-negatives Bakterium, das sich in neutrophilen Granulozyten seines Wirtes vermehrt. Die granulozytäre Anaplasmose äußert sich bei Tieren und Menschen meist als unspezifische fieberhafte Allgemeinerkrankung. Die Fähigkeit von *A. phagocytophilum*, neutrophile Granulozyten als Wirtszelle zu nutzen, ist einzigartig, da gerade diese Zellen des Immunsystems mit einer Vielzahl antimikrobieller Abwehrmechanismen ausgestattet sind. Daher ist es von grundsätzlichem Interesse, die Kontrolle von *A. phagocytophilum* durch neutrophile Granulozyten näher zu analysieren. Für die Untersuchungen dieser Arbeit sind murine *Hoxb8*-Granulozyten als Zellkulturmodell genutzt worden, die durch retrovirale Transduktion mit dem *Hoxb8*-Onkogen generiert worden sind und die funktionelle Ähnlichkeiten zu primären Zellen aufweisen. Diese Methodik ermöglicht einen deutlich höheren Reinheitsgrad und eine unbegrenzte Ausbeute im Vergleich zu ex vivo gewonnenen murinen neutrophilen Granulozyten.

Zytokine und Chemokine sind vermutlich an der Pathogenese einer *A. phagocytophilum*-Infektion beteiligt. Inwieweit im Rahmen dieser Infektion neutrophile Granulozyten auch als deren Produzenten agieren, war bislang unklar. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass murine *Hoxb8*-Granulozyten nach Stimulation mit *A. phagocytophilum*, „regulated on activation, normal T cell expressed and secreted“ (RANTES), „macrophage inflammatory protein-1 α “ (MIP-1 α) und Tumornekrosefaktor (TNF) produzieren. In-vivo-Untersuchungen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Freiburg im Breisgau haben zuvor ergeben, dass die Effektormechanismen neutrophiler Granulozyten wie Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat(NADPH)-Oxidase, induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und Myelo-peroxidase (MPO) für die Erregerelimination in vivo nicht notwendig sind. Anhand der vorliegenden In-vitro-Studie wird nachgewiesen, dass ein Fehlen dieser Effektormechanismen keinen Einfluss auf das Wachstum von *A. phagocytophilum* in *Hoxb8*-Granulozyten hat. Dies lässt vermuten, dass der Erreger Strategien entwickelt hat, um diesen Abwehrmechanismen zu entkommen.

Interferon- γ (IFN- γ) ist ein wichtiger Modulator der Funktion neutrophiler Granulozyten. Anhand der Ergebnisse dieser Studie lässt sich zeigen, dass eine direkte IFN- γ -Stimulation von murinen *Hoxb8*-Granulozyten zu einer deutlichen Wachstumshemmung von *A. phagocytophilum* führt. Trotz deutlicher Induktion der iNOS-mRNA-Expression durch die

Infektion sowie die IFN- γ -Stimulation ist dieser Effekt iNOS-unabhängig. IFN- γ -defiziente Mäuse hatten in vorausgegangenen Untersuchungen eine erhöhte bakterielle Beladung in der Frühphase der Infektion gezeigt, während die finale Erregerelimination unbeeinträchtigt blieb. Die Untersuchungen dieser Arbeit haben nun ergeben, dass eine direkte IFN- γ -Wirkung auf neutrophile Granulozyten wesentlich an dem in vivo beobachteten protektiven Effekt beteiligt ist.

7 Summary

Immunological control of *Anaplasma phagocytophilum* by murine neutrophil granulocytes

A. phagocytophilum is a tick-transmitted obligate intracellular Gram-negative bacterium, which replicates within its host's neutrophil granulocytes. The human and animal granulocytic anaplasmosis often manifests as a nonspecific febrile illness. The ability of *A. phagocytophilum* to use particularly neutrophil granulocytes as suitable hosts is made unique by the multitude of their antimicrobial defense mechanisms. It is therefore of considerable interest to more closely investigate the immunological control of *A. phagocytophilum* by neutrophil granulocytes. The chosen cell culture model for the analysis was murine *Hoxb8*-granulocytes, generated by retroviral transduction with the *Hoxb8*-oncogene. These generated cells exhibit functional similarity to primary cells. This technique enables a notably higher level of purity and allowed unlimited production in comparison with ex vivo produced murine neutrophil granulocytes.

Cytokines and chemokines are presumably involved in the pathogenesis of a *A. phagocytophilum* infection. The extent up to which the neutrophil granulocytes act as their producer during a *A. phagocytophilum* infection was until now unknown. This study shows that murine *Hoxb8*-granulocytes produce regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and tumor necrosis factor (TNF), after stimulation with *A. phagocytophilum*. In vivo studies at the Institute of Microbiology and Hygiene had already showed that the effector mechanisms of neutrophil granulocytes, such as nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and myeloperoxidase (MPO), were not required for pathogen elimination in vivo. This in vitro study demonstrates that the absence of these effector mechanisms has no influence on the growth of *A. phagocytophilum* in *Hoxb8*-granulocytes. This suggests that the pathogen has developed strategies to evade these defense mechanisms.

Interferon- γ (IFN- γ) is an important modulator of the neutrophil granulocyte function. The results of this study demonstrate that a direct IFN- γ -stimulation of murine *Hoxb8*-granulocytes leads to a direct growth inhibition of *A. phagocytophilum*. Despite a noticeable induction of the iNOS mRNA-expression, due to the infection and IFN- γ -stimulation, was this effect however iNOS-independent. In previous studies IFN- γ -deficient mice exhibited an increased bacterial load during the early phase of the infection, whereas the final pathogen elimination remained unimpaired. The conclusion of this study is that a direct IFN- γ -effect on neutrophil granulocytes is essentially involved in the in vivo observed protective effect.

8 Literaturverzeichnis

1. Rikihisa, Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8(5): 328-39.
2. Stuen, S., E.G. Granquist, and C. Silaghi. *Anaplasma phagocytophilum*- a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013, 3: 31.
3. Woldehiwet, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* 2010, 167(2-4): 108-22.
4. Gordon, W.S., A. Brownlee, D.R. Wilson, and J. MacLeod. Tick-borne fever (a hitherto undescribed disease of sheep). *J. Comp. Pathol.* 1932, 45: 301-12.
5. Chen, S.-M., J.S. Dumler, J.S. Bakken, and D.H. Walker. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32(3): 589-95.
6. Hudson, J.R. The recognition off tick-borne fever as a disease of cattle. *Br. Vet. J.* 1950, 106: 3-17.
7. Foster, W.N.M. and J.C. Greig. Isolation of tick-borne fever from feral goats in New Galloway. *Vet. Rec.* 1969, 85(21): 585-6.
8. Gribble, D.H. Equine ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1969, 155(2): 462-9.
9. Madewell, B.R. and D.H. Gribble. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1982, 180(5): 512-4.
10. Dzięgiel, B., L. Adaszek, M. Kalinowski, and S. Winiarczyk. Equine granulocytic anaplasmosis. *Res. Vet. Sci.* 2013, 95(2): 316-20.
11. Carrade, D.D., J.E. Foley, D.L. Borjesson, and J.E. Sykes. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J. Vet. Intern. Med.* 2009, 23(6): 1129-41.
12. Bjöersdorff, A., L. Svendenius, J. Owens, and R. Massung. Feline granulocytic ehrlichiosis - a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. *J. Small Anim. Pract.* 1999, 40(1): 20-4.
13. Little, S.E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2010, 40(6): 1121-40.
14. CDC. Summary of Notifiable Diseases - United States, 2011. *MMWR* 2013, 60(53): 1-117.
15. Blanco, J.R. and J.A. Oteo. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002, 8(12): 763-72.
16. Strle, F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004, 293 Suppl. 37: 27-35.
17. Dumler, J.S., A.F. Barbet, C.P.J. Bekker, G.A. Dasch, G.H. Palmer, S.C. Ray, Y. Rikihisa, and F.R. Rurangirwa. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of

- Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001, 51(6): 2145-65.
18. Hodzic, E., D. Fish, C.M. Maretzki, A.M. De Silva, S. Feng, and S.W. Barthold. Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36(12): 3574-8.
 19. Katavolos, P., P.M. Armstrong, J.E. Dawson, and S.R. Telford, 3rd. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J. Infect. Dis.* 1998, 177(5): 1422-5.
 20. Rar, V. and I. Golovljova. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "*Candidatus* Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect. Genet. Evol.* 2011, 11(8): 1842-61.
 21. Dhand, A., R.B. Nadelman, M. Agüero-Rosenfeld, F.A. Haddad, D.P. Stokes, and H.W. Horowitz. Human granulocytic anaplasmosis during pregnancy: case series and literature review. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 45(5): 589-93.
 22. Horowitz, H.W., E. Kilchevsky, S. Haber, M. Agüero-Rosenfeld, R. Kranwinkel, E.K. James, S.J. Wong, F. Chu, D. Liveris, and I. Schwartz. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N. Engl. J. Med.* 1998, 339(6): 375-8.
 23. Jereb, M., B. Pecaver, J. Tomazic, I. Muzlovic, T. Avsic-Zupanc, T. Premru-Srsen, S. Levicnik-Stezinar, P. Karner, and F. Strle. Severe human granulocytic anaplasmosis transmitted by blood transfusion. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18(8): 1354-7.
 24. Alhumaidan, H., B. Westley, C. Esteva, V. Berardi, C. Young, and J. Sweeney. Transfusion-transmitted anaplasmosis from leukoreduced red blood cells. *Transfusion* 2013, 53(1): 181-6.
 25. Annen, K., K. Friedman, C. Eshoa, M. Horowitz, J. Gottschall, and T. Straus. Two cases of transfusion-transmitted *Anaplasma phagocytophilum*. *Am. J. Clin. Pathol.* 2012, 137(4): 562-5.
 26. Shields, K., M. Cumming, J. Rios, M.T. Wong, J.I. Zwicker, S.L. Stramer, and C.D. Alonso. Transfusion-associated *Anaplasma phagocytophilum* infection in a pregnant patient with thalassemia trait: a case report. *Transfusion* 2015, 55(4): 719-25.
 27. Zhang, L., Y. Liu, D. Ni, Q. Li, Y. Yu, X.-J. Yu, K. Wang, D. Li, G. Liang, X. Jiang, H. Jing, J. Run, M. Luan, X. Fu, J. Zhang, W. Yang, Y. Wang, J.S. Dumler, Z. Feng, J. Ren, and J. Xu. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA* 2008, 300(19): 2263-70.
 28. Krause, P.J. and G.P. Wormser. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis? *JAMA* 2008, 300(19): 2308-9.
 29. Xu, B., L. Liu, X. Hunang, H. Ma, Y. Zhang, Y. Du, P. Wang, X. Tang, H. Wang, K. Kang, S. Zhang, G. Zhao, W. Wu, Y. Yang, H. Chen, F. Mu, and W. Chen. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus. *PLoS Pathog.* 2011, 7(11): e1002369.
 30. Cui, F., H.-X. Cao, L. Wang, S.-F. Zhang, S.-J. Ding, X.-J. Yu, and H. Yu. Clinical and epidemiological study on severe fever with thrombocytopenia syndrome in Yiyuan County, Shandong Province, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013, 88(3): 510-2.

31. Yu, X.-J., M.-F. Liang, S.-Y. Zhang, Y. Liu, J.-D. Li, Y.-L. Sun, L. Zhang, Q.-F. Zhang, V.L. Popov, C. Li, J. Qu, Q. Li, Y.-P. Zhang, R. Hai, W. Wu, Q. Wang, F.-X. Zhan, X.-J. Wang, B. Kan, S.-W. Wang, K.-L. Wan, H.-Q. Jing, J.-X. Lu, W.-W. Yin, H. Zhou, X.-H. Guan, J.-F. Liu, Z.-Q. Bi, G.-H. Liu, J. Ren, H. Wang, Z. Zhao, J.-D. Song, J.-R. He, T. Wan, J.-S. Zhang, X.-P. Fu, L.-N. Sun, X.-P. Dong, Z.-J. Feng, W.-Z. Yang, T. Hong, Y. Zhang, D.H. Walker, Y. Wang, and D.-X. Li. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N. Engl. J. Med.* 2011, 364: 1523-32.
32. Plier, M.L., E.B. Breitschwerdt, B.C. Hegarty, and L.B. Kidd. Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2009, 45(5): 232-8.
33. Henniger, T., P. Henniger, T. Grossmann, O. Distl, M. Ganter, and F.D. von Loewenich. Congenital infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a calf in northern Germany. *Acta Vet. Scand.* 2013, 55(1): 38.
34. Baumgarten, B.U., M. Röllinghoff, and C. Bogdan. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37(11): 3448-51.
35. Fingerle, V., U.G. Munderloh, G. Liegl, and B. Wilske. Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from southern Germany. *Med. Microbiol. Immunol.* 1999, 188(3): 145-9.
36. von Loewenich, F.D., B.U. Baumgarten, K. Schröppel, W. Geißdörfer, M. Röllinghoff, and C. Bogdan. High diversity of *ankA* sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41(11): 5033-40.
37. Büscher, G., R. Gandras, G. Apel, and K.T. Friedhoff. Der erste Fall von Ehrlichiosis beim Pferd in Deutschland. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 1984, 91(11-12): 408-9.
38. von Loewenich, F.D., G. Stumpf, B.U. Baumgarten, M. Röllinghoff, J.S. Dumler, and C. Bogdan. A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HGE Agent) in Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003, 22(5): 303-5.
39. Jensen, J., D. Simon, H. Murua Escobar, J.T. Soller, J. Bullerdiek, P. Beelitz, K. Pfister, and I. Nolte. *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health* 2007, 54(2): 94-101.
40. Scharf, W., S. Schauer, F. Freyburger, M. Petrovec, D. Schaarschmidt-Kiener, G. Liebisch, M. Runge, M. Ganter, A. Kehl, J.S. Dumler, A.L. Garcia-Perez, J. Jensen, V. Fingerle, M.L. Meli, A. Ensser, S. Stuen, and F.D. von Loewenich. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49(3): 790-6.
41. Nieder, M., C. Silaghi, D. Hamel, K. Pfister, R. Schmäsckke, and M. Pfeffer. Tick-borne fever caused by *Anaplasma phagocytophilum* in Germany: first laboratory confirmed case in a dairy cattle herd. *Tierärztl. Prax. Ausg. G Grosstiere Nutztiere* 2012, 40(2): 101-6.
42. Schaarschmidt-Kiener, D., F. Graf, D. von Loewenich, and W. Müller. *Anaplasma phagocytophilum* Infektion bei einer Katze in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilkund.* 2009, 151(7): 336-41.
43. Kirtz, G., M.L. Meli, H. Lutz, V. Büchele, P. Niederl, P. Ludwig, B. Czettel, D. Thum, and E. Leidinger. *Anaplasma phagocytophilum* infection in two cats in Austria *Kleintierpraxis* 2005, 50: 489-94.

44. Fingerle, V., J.L. Goodman, R.C. Johnson, T.J. Kurtti, U.G. Munderloh, and B. Wilske. Human granulocytic Ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35(12): 3244-7.
45. Hunfeld, K.-P. and V. Brade. Prevalence of antibodies against the human granulocytic ehrlichiosis agent in Lyme borreliosis patients from Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1999, 18(3): 221-4.
46. Jin, H., F. Wei, Q. Liu, and J. Qian. Epidemiology and control of human granulocytic anaplasmosis: a systematic review. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012, 12(4): 269-74.
47. Silaghi, C., G. Liebisch, and K. Pfister. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasit. Vectors* 2011, 4: 161.
48. Kohn, B., D. Galke, P. Beelitz, and K. Pfister. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2008, 22(6): 1289-95.
49. Kohn, B., C. Silaghi, D. Galke, G. Arndt, and K. Pfister. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res. Vet. Sci.* 2011, 91(1): 71-6.
50. Huhn, C., C. Winter, T. Wolfesperger, N. Wüppenhorst, K. Strašek Smrdel, J. Skuballa, M. Pfäffle, T. Petney, C. Silaghi, V. Dyachenko, N. Pantchev, R.K. Straubinger, D. Schaarschmidt-Kiener, M. Ganter, M.L. Aardema, and F.D. von Loewenich. Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. *PLoS One* 2014, 9(4): e93725.
51. Anderson, J.F. The natural history of ticks. *Med. Clin. North. Am.* 2002, 86(2): 205-18.
52. Ogden, N.H., A.N.J. Casey, Z. Woldehiwet, and N.P. French. Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phases of infection. *Infect. Immun.* 2003, 71(4): 2071-8.
53. Rikihisa, Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011, 24(3): 469-89.
54. Stafford, K.C.I., R.F. Massung, L.A. Magnarelli, J.W. IJdo, and J.F. Anderson. Infection with agents of human granulocytic ehrlichiosis, Lyme disease, and babesiosis in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in Connecticut. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37(9): 2887-92.
55. Telford, S.R.I., J.E. Dawson, P. Katavolos, C.K. Warner, C.P. Kolbert, and D.H. Persing. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93(12): 6209-14.
56. Schorn, S., K. Pfister, H. Reulen, M. Mahling, J. Manitz, C. Thiel, and C. Silaghi. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011, 2(4): 196-203.
57. Woldehiwet, Z. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1078: 446-60.
58. Foley, J., N.C. Nieto, J. Madigan, and J. Sykes. Possible differential host tropism in *Anaplasma phagocytophilum* strains in the Western United States. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008, 1149: 94-7.
59. Foggie, A. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* 1951, 63(1): 1-15.

60. Barlough, J.E., J.E. Madigan, E. DeRock, J.S. Dumler, and J.S. Bakken. Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the human granulocytotropic *Ehrlichia* (HGE agent). *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33(12): 3333-4.
61. Stuen, S., K. Artursson, and E. Olsson Engvall. Experimental infection of lambs with an equine granulocytic *Ehrlichia* species resembling the agent that causes human granulocytic ehrlichiosis (HGE). *Acta Vet. Scand.* 1998, 39(4): 491-7.
62. Pusterla, N., J.B. Pusterla, U. Braun, and H. Lutz. Experimental cross-infections with *Ehrlichia phagocytophila* and human granulocytic ehrlichia-like agent in cows and horses. *Vet. Rec.* 1999, 145(11): 311-4.
63. Pusterla, N., R.J. Anderson, J.K. House, J.B. Pusterla, E. DeRock, and J.E. Madigan. Susceptibility of cattle to infection with *Ehrlichia equi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001, 218(7): 1160-2.
64. Scorpio, D.G., J.S. Dumler, N.C. Barat, J.A. Cook, C.E. Barat, B.A. Stillman, K.C. DeBisceglie, M.J. Beall, and R. Chandrashekar. Comparative strain analysis of *Anaplasma phagocytophilum* infection and clinical outcomes in a canine model of granulocytic anaplasmosis. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011, 11(3): 223-9.
65. Stuen, S. *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet. Res. Commun.* 2007, 31, Suppl. 1: 79-84.
66. Massung, R.F., M.J. Muel, J.H. Owens, N. Allan, J.W. Courtney, K.C.I. Stafford, and T.N. Mather. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, 8(5): 467-72.
67. Massung, R.F., R.A. Priestley, N.J. Miller, T.N. Mather, and M.L. Levin. Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. *J. Infect. Dis.* 2003, 188(11): 1757-63.
68. Massung, R.F., T.N. Mather, and M.L. Levin. Reservoir competency of goats for the Ap-variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect. Immun.* 2006, 74(2): 1373-5.
69. Foley, J.E., L. Crawford-Miksza, J.S. Dumler, C. Glaser, J.-S. Chae, E. Yeh, D. Schnurr, R. Hood, W. Hunter, and J.E. Madigan. Human granulocytic Ehrlichiosis in Northern California: two case descriptions with genetic analysis of the Ehrlichiae. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 29(2): 388-92.
70. Bown, K.J., X. Lambin, N.H. Ogden, M. Begon, G. Telford, Z. Woldehiwet, and R.J. Birtles. Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, 15(12): 1948-54.
71. Bown, K.J., X. Lambin, N.H. Ogden, M. Petrovec, S.E. Shaw, Z. Woldehiwet, and R.J. Birtles. High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45(6): 1771-6.
72. Casey, A.N., R.J. Birtles, A.D. Radford, K.J. Bown, N.P. French, Z. Woldehiwet, and N.H. Ogden. Groupings of highly similar major surface protein (p44)-encoding paralogues: a potential index of genetic diversity amongst isolates of *Anaplasma phagocytophilum*. *Microbiology* 2004, 150(3): 727-34.
73. Barbet, A.F., B. Al-Khedery, S. Stuen, E.G. Granquist, R.F. Felsheim, and U.G. Munderloh. An emerging tick-borne disease of humans is caused by a subset of strains with conserved genome structure. *Pathogens* 2013, 2(3): 544-55.

74. Chastanger, A., T. Dugat, G. Vourc'h, H. Verheyden, L. Legrand, V. Bachy, L. Chabanne, G. Joncour, R. Maillard, H.J. Boulouis, N. Haddad, J. Bailly, and A. Leblond. Multilocus sequence analysis of *Anaplasma phagocytophilum* reveals three distinct lineages with different host ranges in clinically ill French cattle. *Vet. Res.* 2014, 45(1): 114.
75. Jahfari, S., E.C. Coipan, M. Fonville, A.D. van Leeuwen, P. Hengeveld, D. Heylen, P. Heyman, C. van Maanen, C.M. Butler, G. Foldvari, S. Szekeres, G. van Duijvendijk, W. Tack, J.M. Rijks, J. van der Giessen, W. Takken, S.E. van Wieren, K. Takumi, and H. Sprong. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit. Vectors* 2014, 7: 365.
76. Foley, J.E., N.C. Nieto, A. Barbet, and P. Foley. Antigen diversity in the parasitic bacterium *Anaplasma phagocytophilum* arises from selectively-represented, spatially clustered functional pseudogenes. *PLoS One* 2009, 4(12): e8265.
77. Ismail, N., K.C. Bloch, and J.W. McBride. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin. Lab. Med.* 2010, 30(1): 261-92.
78. Tuomi, J. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 1. Clinical and haematological data, some properties of the causative agent, and homologous immunity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1967, 70(3): 429-45.
79. Brodie, T.A., P.H. Holmes, and G.M. Urquhart. Some aspects of tick-borne diseases of British sheep. *Vet. Rec.* 1986, 118(15): 415-8.
80. Madigan, J.E. and D. Gribble. Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1987, 190(4): 445-8.
81. Pusterla, N. and J.E. Madigan. Equine granulocytic anaplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013, 33(7): 493-6.
82. Madigan, J.E. and N. Pusterla. Ehrlichial diseases. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* 2000, 16(3): 487-99.
83. Franzén, P., A. Aspan, A. Egenvall, A. Gunnarsson, L. Åberg, and J. Pringle. Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Vet. Intern. Med.* 2005, 19(2): 232-9.
84. Madigan, J.E. Equine ehrlichiosis. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* 1993, 9(2): 423-8.
85. Gussmann, K., C. Czech, M. Hermann, D. Schaarschmidt-Kiener, and F.D. von Loewenich. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a horse from Switzerland with severe neurological symptoms. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 2014, 156(7): 345-8.
86. Engvall, E.O. and A. Egenvall. Granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses. *Int. J. Med. Microbiol.* 2002, 291, Suppl. 33: 100-3.
87. Cohn, L.A. Ehrlichiosis and related infections. *Vet. Clin. Small Anim.* 2003, 33(4): 863-84.
88. Tarello, W. Microscopic and clinical evidence for *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* infection in Italian cats. *Vet. Rec.* 2005, 156(24): 772-4.
89. Heikkilä, H.M., A. Bondarenko, A. Mihalkov, K. Pfister, and T. Spillmann. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. *Acta Vet. Scand.* 2010, 52: 62.

90. Adaszek, L., M. Górna, M. Skrzypczak, K. Buczek, I. Balicki, and S. Winiarczyk. Three clinical cases of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in Poland. *J. Feline Med. Surg.* 2013, 15(4): 333-7.
91. Dumler, J.S., J.E. Madigan, N. Pusterla, and J.S. Bakken. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 45, Suppl. 1: S45-51.
92. Dumler, J.S. The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012, 64(1): 13-20.
93. Veronesi, F., F. Passamonti, A. Moretti, G. Morganti, D.M. Vardi, F. Laus, M.L. Marenzoni, A. Spaterna, M. Coletti, and D.P. Fioretti. Evaluation of the performance of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of *Anaplasma phagocytophilum* antibodies in horses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014, 14(5): 317-23.
94. Aguero-Rosenfeld, M. Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: state of the art. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2002, 2(4): 233-9.
95. Allison, R.W. and S.E. Little. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.* 2013, 42(2): 127-44.
96. Schotthoefer, A.M., J.K. Meece, L.C. Ivacic, P.D. Bertz, K. Zhang, T. Weiler, T.S. Uphoff, and T.R. Fritsche. Comparison of a real-time PCR method with serology and blood smear analysis for diagnosis of human anaplasmosis: importance fo infection time course for optimal test utilization. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51(7): 2147-53.
97. Courtney, J.W., L.M. Kostelnik, N.S. Zeidner, and R.F. Massung. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42(7): 3164-8.
98. Bakken, J.S., I. Haller, D. Riddell, J.J. Walls, and J.S. Dumler. The serological response of patients infected with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.* 2002, 34(1): 22-7.
99. Barth, C., R.K. Straubinger, E. Müller, C. Sauter - Louis, and K. Hartmann. Comparison of different diagnostic tools for the detection of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 2014, 43(2): 180-4.
100. Carlyon, J.A. Laboratory maintenance of *Anaplasma phagocytophilum*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2005: 3A.2.1-3A.2.30.
101. Popov, V., V.C. Han, S.-M. Chen, J. Dumler, H.-M. Feng, T. Andreadis, R. Tesh, and D. Walker. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus Ehrlichia. *J. Med. Microbiol.* 1998, 47(3): 235-51.
102. Troese, M.J. and J.A. Carlyon. *Anaplasma phagocytophilum* dense-cored organisms mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand 1. *Infect. Immun.* 2009, 77(9): 4018-27.
103. Mastronunzio, J.E., S. Kurscheid, and E. Fikrig. Postgenomic analyses reveal development of infectious *Anaplasma phagocytophilum* during transmission from ticks to mice. *J. Bacteriol.* 2012, 194(9): 2238-47.
104. Rikihisa, Y., N. Zhi, G.P. Wormser, B. Wen, H.W. Horowitz, and K.E. Hechemy. Ultrastructural and antigenic characterization of a granulocytic ehrlichiosis agent

- directly isolated and stably cultivated from a patient in New York State. *J. Infect. Dis.* 1997, 175(1): 210-3.
105. Lin, M. and Y. Rikihisa. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect. Immun.* 2003, 71(9): 5324-31.
106. Kawai, T. and S. Akira. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011, 34(5): 637-50.
107. von Loewenich, F.D., D.G. Scorpio, U. Reischl, J.S. Dumler, and C. Bogdan. Frontline: Control of *Anaplasma phagocytophilum*, an obligate intracellular pathogen in the absence of inducible nitric oxide synthase, phagocyte NADPH oxidase, tumor necrosis factor, Toll-like receptor (TLR) 2 and 4, or the TLR adaptor molecule MyD88. *Eur. J. Immunol.* 2004, 34(7): 1789-97.
108. Herron, M.J., C.M. Nelson, J. Larson, K.R. Snapp, G.S. Kansas, and J.L. Goodman. Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. *Science* 2000, 288(5471): 1653-6.
109. Lin, M. and Y. Rikihisa. Obligate intracellular parasitism by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* involves caveolae and glycosylphosphatidylinositol-anchored caveolae. *Cell. Microbiol.* 2003, 5(11): 809-20.
110. Goodman, J.L., C.M. Nelson, M.B. Klein, S.F. Hayes, and B.W. Weston. Leucocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand. *J. Clin. Invest.* 1999, 103(3): 407-12.
111. Thomas, V. and E. Fikrig. *Anaplasma phagocytophilum* specifically induces tyrosine phosphorylation of ROCK1 during infection. *Cell. Microbiol.* 2007, 9(7): 1730-7.
112. Truchan, H.K., D. Seidman, and J.A. Carlyon. Breaking in and grabbing a meal: *Anaplasma phagocytophilum* cellular invasion, nutrient acquisition, and promising tools for their study. *Microbes Infect.* 2013, 15(14-15): 1017-25.
113. Ojogun, N., A. Kahlon, S.A. Ragland, M.J. Troese, J.E. Mastronunzio, N.J. Walker, L. Viebrock, R.J. Thomas, D.L. Borjesson, E. Fikrig, and J.A. Carlyon. *Anaplasma phagocytophilum* outer membrane protein A interacts with sialylated glycoproteins to promote infection of mammalian host cells. *Infect. Immun.* 2012, 80(11): 3748-60.
114. Kahlon, A., N. Ojogun, S.A. Ragland, D. Seidman, M.J. Troese, A.K. Ottens, J.E. Mastronunzio, H.K. Truchan, N.J. Walker, D.L. Borjesson, E. Fikrig, and J.A. Carlyon. *Anaplasma phagocytophilum* Asp14 is an invasin that interacts with mammalian host cells via its C terminus to facilitate infection. *Infect. Immun.* 2013, 81(1): 65-79.
115. Park, J., K.S. Choi, and J.S. Dumler. Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. *Infect. Immun.* 2003, 71(7): 4018-25.
116. Wang, X., T. Kikuchi, and Y. Rikihisa. Two monoclonal antibodies with defined epitopes of P44 major surface proteins neutralize *Anaplasma phagocytophilum* by distinct mechanisms. *Infect. Immun.* 2006, 74(3): 1873-82.
117. Seidman, D., N. Ojogun, N.J. Walker, J. Mastronunzio, A. Kahlon, K.S. Hebert, S. Karandashova, D.P. Miller, B.K. Tegels, R.T. Marconi, E. Fikrig, D.L. Borjesson, and J.A. Carlyon. *Anaplasma phagocytophilum* surface protein AipA mediates invasion of mammalian host cells. *Cell. Microbiol.* 2014, 16(8): 1133-45.

118. Munderloh, U.G., M.J. Lynch, M.J. Herron, A.T. Palmer, T.J. Kurtti, R.D. Nelson, and J.L. Goodman. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet. Microbiol.* 2004, 101(1): 53-64.
119. Ojogun, N., B. Barnstein, B. Huang, C.A. Oskeritzian, J.W. Homeister, D. Miller, J.J. Ryan, and J.A. Carlyon. *Anaplasma phagocytophilum* infects mast cells via α 1,3-fucosylated but not sialylated glycans and inhibits IgE-mediated cytokine production and histamine release. *Infect. Immun.* 2011, 79(7): 2717-26.
120. Granick, J.L., D.V. Reneer, J.A. Carlyon, and D.L. Borjesson. *Anaplasma phagocytophilum* infects cells of the megakaryocytic lineage through sialylated ligands but fails to alter platelet production. *J. Med. Microbiol.* 2008, 57(4): 416-23.
121. Klein, M.B., S.F. Hayes, and J.L. Goodman. Monocytic differentiation inhibits infection and granulocytic differentiation potentiates infection by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Infect. Immun.* 1998, 66(7): 3410-5.
122. Chen, G., M.S. Severo, O.S. Sakhon, A. Choy, M.J. Herron, R.F. Felsheim, H. Wiryawan, J. Liao, J.L. Johns, U.G. Munderloh, F.S. Sutterwala, M. Kotsyfakis, and J.H.F. Pedra. *Anaplasma phagocytophilum* dihydrolipoamide dehydrogenase 1 affects host-derived immunopathology during microbial colonization. *Infect. Immun.* 2012, 80(9): 3194-205.
123. Herron, M.J., M.E. Ericson, T.J. Kurtti, and U.G. Munderloh. The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005, 1063: 374-82.
124. Webster, P., J.W. IJdo, L.M. Chicoine, and E. Fikrig. The agent of human granulocytic ehrlichiosis resides in an endosomal compartment. *J. Clin. Invest.* 1998, 101(9): 1932-41.
125. Mott, J., R.E. Barnewall, and Y. Rikihisa. Human granulocytic ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells. *Infect. Immun.* 1999, 67(3): 1368-78.
126. Levine, B., N. Mizushima, and H.W. Virgin. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011, 469(7330): 323-35.
127. Niu, H., M. Yamaguchi, and Y. Rikihisa. Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell. Microbiol.* 2008, 10(3): 593-605.
128. Niu, H., Q. Xiong, A. Yamamoto, M. Hayashi-Nishino, and Y. Rikihisa. Autophagosomes induced by a bacterial Beclin 1 binding protein facilitate obligatory intracellular infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109(51): 20800-7.
129. Lee, H.C. and J.L. Goodman. *Anaplasma phagocytophilum* causes global induction of antiapoptosis in human neutrophils. *Genomics* 2006, 88(4): 496-503.
130. Pedra, J.H., B. Sukumaran, J.A. Carlyon, N. Berliner, and E. Fikrig. Modulation of NB4 promyelocytic leukemic cell machinery by *Anaplasma phagocytophilum*. *Genomics* 2005, 86(3): 365-77.
131. Sukumaran, B., J.A. Carlyon, J.-L. Cai, N. Berliner, and E. Fikrig. Early transcriptional response of human neutrophils to *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Infect. Immun.* 2005, 73(12): 8089-99.

132. Lee, H.C., M. Kioi, J. Han, R.K. Puri, and J.L. Goodman. *Anaplasma phagocytophilum*-induced gene expression in both human neutrophils and HL-60 cells. *Genomics* 2008, 92(3): 144-51.
133. Woldehiwet, Z. and C. Yavari. *Anaplasma phagocytophilum* up-regulates some anti-apoptotic genes in neutrophils and pro-inflammatory genes in mononuclear cells of sheep. *J. Comp. Pathol.* 2014, 150(4): 351-6.
134. Borjesson, D.L., S.D. Kobayashi, A.R. Whitney, J.M. Voyich, C.M. Argue, and F.R. Deleo. Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *J. Immunol.* 2005, 174(10): 6364-72.
135. Ge, Y., K. Yoshiie, F. Kuribayashi, M. Lin, and Y. Rikihisa. *Anaplasma phagocytophilum* inhibits human neutrophil apoptosis via upregulation of bfl-1, maintenance of mitochondrial membrane potential and prevention of caspase 3 activation. *Cell. Microbiol.* 2005, 7(1): 29-38.
136. Ge, Y. and Y. Rikihisa. *Anaplasma phagocytophilum* delays spontaneous human neutrophil apoptosis by modulation of multiple apoptotic pathways. *Cell. Microbiol.* 2006, 8(9): 1406-16.
137. Niu, H., V. Kozjak-Pavlovic, T. Rudel, and Y. Rikihisa. *Anaplasma phagocytophilum* Ats-1 is imported into host cell mitochondria and interferes with apoptosis induction. *PLoS Pathog.* 2010, 6(2): e1000774.
138. Sarkar, A., L. Hellberg, A. Bhattacharyya, M. Behnen, K. Wang, J.M. Lord, S. Moller, M. Kohler, W. Solbach, and T. Laskay. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* activates the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and NF-kappaB survival pathways in neutrophil granulocytes. *Infect. Immun.* 2012, 80(4): 1615-23.
139. Scapini, P., J.A. Lapinet - Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M.A. Cassatella. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* 2000, 177(1): 195-203.
140. Severo, M.S., K.D. Stephens, M. Kotsyfakis, and J.H. Pedra. *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiol.* 2012, 7(6): 719-31.
141. Borjesson, D.L. and S.W. Barthold. The mouse as a model for investigation of human granulocytic ehrlichiosis: current knowledge and future directions. *Comp. Med.* 2002, 52(5): 403-13.
142. Bunnell, J.E., E.R. Trigiani, S.R. Srinivas, and J.S. Dumler. Development and distribution of pathologic lesions are related to immune status and tissue deposition of human granulocytic ehrlichiosis agent-infected cells in a murine model system. *J. Infect. Dis.* 1999, 180(2): 546-50.
143. Hodzic, E., J.W.I. IJdo, S. Feng, P. Katavolos, W. Sun, C.H. Maretzki, D. Fish, E. Fikrig, S.R.I. Telford, and S.W. Barthold. Granulocytic ehrlichiosis in the laboratory mouse. *J. Infect. Dis.* 1998, 177(3): 737-45.
144. Sun, W., J.W.I. IJdo, S.R.I. Telford, E. Hodzic, Y. Zhang, S.W. Barthold, and E. Fikrig. Immunization against the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a murine model. *J. Clin. Invest.* 1997, 100(12): 3014-8.

145. Borjesson, D.L., S.I. Simon, F. Tablin, and S.W. Barthold. Thrombocytopenia in a mouse model of human granulocytic ehrlichiosis. *J. Infect. Dis.* 2001, 184(11): 1475-9.
146. Ermert, D., C.F. Urban, B. Laube, C. Goosmann, A. Zychlinsky, and V. Brinkmann. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *J. Innate Immun.* 2009, 1(3): 181-93.
147. Siemsen, D.W., N. Malachowa, I.A. Schepetkin, A.R. Whitney, L.N. Kirpotina, B. Lei, F.R. Deleo, and M.T. Quinn. Neutrophil isolation from nonhuman species. *Methods Mol. Biol.* 2014, 1124: 19-37.
148. Pruneau, L., A. Moumène, D.F. Meyer, I. Marcelino, T. Lefrançois, and N. Vachiéry. Understanding *Anaplasmataceae* pathogenesis using "Omics" approaches. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014, 4: 86.
149. Passos, L.M. In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in tick cell lines: a review. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2012, 21(2): 81-6.
150. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6(3): 173-82.
151. Amulic, B., C. Cazalet, G.L. Hayes, K.D. Metzler, and A. Zychlinsky. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2012, 30: 459-89.
152. Birkner, K., B. Steiner, C. Rinkler, Y. Kern, P. Aichele, C. Bogdan, and F.D. von Loewenich. The elimination of *Anaplasma phagocytophilum* requires CD4⁺ T cells, but is independent of Th1 cytokines and a wide spectrum of effector mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 2008, 38(12): 3395-410.
153. Panday, A., M.K. Sahoo, D. Osorio, and S. Batra. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell. Mol. Immunol.* 2015, 12(1): 5-23.
154. Roos, D., R. van Bruggen, and C. Meischl. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003, 5(14): 1307-15.
155. Banerjee, R., J. Anguita, D. Roos, and E. Fikrig. Cutting Edge: Infection by the agent of human granulocytic ehrlichiosis prevents the respiratory burst by down-regulating gp91phox. *J. Immunol.* 2000, 164(8): 3946-9.
156. Mott, J. and Y. Rikihisa. Human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits superoxide anion generation by human neutrophils. *Infect. Immun.* 2000, 68(12): 6697-703.
157. Wang, T., S.E. Malawista, U. Pal, M. Grey, J. Meek, M. Akkoyunlu, V. Thomas, and E. Fikrig. Superoxide anion production during *Anaplasma phagocytophila* infection. *J. Infect. Dis.* 2002, 186(2): 274-80.
158. Carlyon, J.A., D.A. Latif, M. Pypaert, P. Lacy, and E. Fikrig. *Anaplasma phagocytophilum* utilizes multiple host evasion mechanisms to thwart NADPH oxidase-mediated killing during neutrophil infection. *Infect. Immun.* 2004, 72(8): 4772-83.
159. IJdo, J.W. and A.C. Mueller. Neutrophil NADPH oxidase is reduced at the *Anaplasma phagocytophilum* phagosome. *Infect. Immun.* 2004, 72(9): 5392-401.
160. Garcia-Garcia, J.C., K.E. Rennoll-Bankert, S. Pelly, A.M. Milstone, and J.S. Dumler. Silencing of host cell CYBB gene expression by the nuclear effector AnkA of the

- intracellular pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect. Immun.* 2009, 77(6): 2385-91.
161. Carlyon, J.A., W.T. Chan, J. Galan, D. Roos, and E. Fikrig. Repression of *rac2* mRNA expression by *Anaplasma phagocytophila* is essential to the inhibition of superoxide production and bacterial proliferation. *J. Immunol.* 2002, 169(12): 7009-18.
162. Thomas, V., S. Samanta, C. Wu, N. Berliner, and E. Fikrig. *Anaplasma phagocytophilum* modulates gp91phox gene expression through altered interferon regulatory factor 1 and PU.1 levels and binding of CCAAT displacement protein. *Infect. Immun.* 2005, 73(1): 208-18.
163. Thomas, V., S. Samanta, and E. Fikrig. *Anaplasma phagocytophilum* increases cathepsin L activity, thereby globally influencing neutrophil function. *Infect. Immun.* 2008, 76(11): 4905-12.
164. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2001, 2(10): 907-16.
165. Xie, Q.W., H.J. Cho, J. Calaycay, R.A. Mumford, K.M. Swiderek, T.D. Lee, A. Ding, T. Troso, and C. Nathan. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992, 256(5054): 225-8.
166. Takeichi, O., I. Saito, Y. Okamoto, T. Tsurumachi, and T. Saito. Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide in vivo by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1998, 93(2): 275-80.
167. Nauseef, W.M. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell. Microbiol.* 2014, 16(8): 1146-55.
168. Bogdan, C., M. Röllinghoff, and A. Diefenbach. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2000, 12(1): 64-76.
169. Klebanoff, S.J., A.J. Kettle, H. Rosen, C.C. Winterbourn, and W.M. Nauseef. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J. Leukoc. Biol.* 2013, 93(2): 185-98.
170. Klebanoff, S. Oxygen metabolites from phagocytes. *Inflammation: basic principles and clinical correlates* 1992, 541: 541-99.
171. Browning, M.D., J.W. Garyu, J.S. Dumler, and D.G. Scorpio. Role of reactive nitrogen species in development of hepatic injury in a C57BL/6 mouse model of human granulocytic anaplasmosis. *Comp. Med.* 2006, 56(1): 55-62.
172. Mantovani, A., M.A. Cassatella, C. Constantini, and S. Jaillon. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Rev. Immunol.* 2011, 11(8): 519-31.
173. Akkoyunlu, M., S.E. Malawista, J. Anguita, and E. Fikrig. Exploitation of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Infect. Immun.* 2001, 69(9): 5577-88.
174. Klein, M.B., S. Hu, C.C. Chao, and J.L. Goodman. The agent of human granulocytic ehrlichiosis induces the production of myelosuppressing chemokines without induction of proinflammatory cytokines. *J. Infect. Dis.* 2000, 182(1): 200-5.

175. Kim, H.Y. and Y. Rikihisa. Expression of interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in human peripheral blood leukocytes exposed to human granulocytic ehrlichiosis agent or recombinant major surface protein P44. *Infect. Immun.* 2000, 68(6): 3394-402.
176. Dumler, J.S., E.R. Triggiani, J.S. Bakken, M.E. Aguero-Rosenfeld, and G.P. Wormser. Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000, 7(1): 6-8.
177. Pedra, J.H.F., J. Mattner, J. Tao, S.M. Kerfoot, R.J. Davis, R.A. Flavell, P.W. Askenase, Z. Yin, and E. Fikrig. c-Jun NH₂-terminal kinase 2 inhibits gamma interferon production during *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Infect. Immun.* 2008, 76(1): 308-16.
178. Pedra, J.H.F., F.S. Sutterwala, B. Sukumaran, Y. Ogura, F. Qian, R.R. Montgomery, R.A. Flavell, and E. Fikrig. ASC/PYCARD and caspase-1 regulate the IL-18/IFN-g axis during *Anaplasma phagocytophilum* infection. *J. Immunol.* 2007, 179(7): 4783-91.
179. Pedra, J.H.F., J. Tao, F.S. Sutterwala, B. Sukumaran, N. Berliner, L.K. Bockenstedt, R.A. Flavell, Z. Yin, and E. Fikrig. IL-12/23p40-dependent clearance of *Anaplasma phagocytophilum* in the murine model of human anaplasmosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007, 50(3): 401-10.
180. Akkoyunlu, M. and E. Fikrig. Gamma interferon dominates the murine cytokine response to the agent of human granulocytic ehrlichiosis and helps to control the degree of early rickettsemia. *Infect. Immun.* 2000, 68(4): 1827-33.
181. Martin, M.E., J.E. Bunnell, and J.S. Dumler. Pathology, immunohistology, and cytokine responses in early phases of human granulocytic ehrlichiosis in a murine model. *J. Infect. Dis.* 2000, 181(1): 374-8.
182. Borjesson, D.L., S.I. Simon, E. Hodzic, C.M. Ballantyne, and S.W. Barthold. Kinetics of CD11b/CD18 up-regulation during infection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis in mice. *Lab. Invest.* 2002, 82(3): 303-11.
183. Choi, K.-S., T. Webb, M. Oelke, D.G. Scorpio, and J.S. Dumler. Differential innate immune cell activation and proinflammatory response in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Infect. Immun.* 2007, 75(6): 3124-30.
184. Martin, M.E., K. Caspersen, and J.S. Dumler. Immunopathology and ehrlichial propagation are regulated by interferon-g and interleukin-10 in a murine model of human granulocytic ehrlichiosis. *Am. J. Pathol.* 2001, 158(5): 1881-8.
185. Choi, K.S. and J.S. Dumler. *Anaplasma phagocytophilum*, interferon gamma production and Stat1 signaling. *Microbiol. Immunol.* 2013, 57(3): 207-12.
186. Kerksiek, K.M. and E.G. Pamer. T cell responses to bacterial infection. *Curr. Opin. Immunol.* 1999, 11(4): 400-5.
187. Gregory, S.H. and C.C. Liu. CD8+ T-cell-mediated response to *Listeria monocytogenes* taken up in the liver and replicating within hepatocytes. *Immunol. Rev.* 2000, 174(1): 112-22.
188. Ulevitch, R.J., J.C. Mathison, and J. da Silva Correia. Innate immune responses during infection. *Vaccine* 2004, 22, Suppl. 1: S25-S30.

189. Sorbara, M.T. and D.J. Philpott. Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. *Immunol. Rev.* 2011, 243(1): 40-60.
190. Choi, K.-S., D.G. Scorpio, and J.S. Dumler. *Anaplasma phagocytophilum* ligation to toll-like receptor (TLR) 2, but not to TLR4, activates macrophages for nuclear factor- κ B nuclear translocation. *J. Infect. Dis.* 2004, 189(10): 1921-5.
191. Sukumaran, B., Y. Ogura, J.H. Pedra, K.S. Kobayashi, R.A. Flavell, and E. Fikrig. Receptor interacting protein-2 contributes to host defense against *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012, 66(2): 211-9.
192. Kim, H.-Y. and Y. Rikihisa. Characterization of monoclonal antibodies to the 44-kilodalton major outer membrane protein to the human granulocytic ehrlichiosis agent. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36(11): 3278-84.
193. Levin, M., D.J. Coble, and D.E. Ross. Reinfection with *Anaplasma phagocytophilum* in BALB/c mice and cross-protection between two sympatric isolates. *Infect. Immun.* 2004, 72(8): 4723-30.
194. Wang, G.G., K.R. Calvo, M.P. Pasillas, D.B. Sykes, H. Hacker, and M.P. Kamps. Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. *Nat. Methods* 2006, 3(4): 287-93.
195. Rosas, M., F. Osorio, M.J. Robinson, L.C. Davies, N. Dierkes, S.A. Jones, C. Reis e Sousa, and P.R. Taylor. Hoxb8 conditionally immortalised macrophage lines model inflammatory monocytic cells with important similarity to dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2011, 41(2): 356-65.
196. McDonald, J.U., A. Cortini, M. Rosas, L. Fossati-Jimack, G.S. Ling, K.J. Lewis, S. Dewitt, K. Liddiard, G.D. Brown, S.A. Jones, M.B. Hallet, M. Botto, and P.R. Taylor. *In vivo* functional analysis and genetic modification of *in vitro*-derived mouse neutrophils. *FASEB* 2011, 25(6): 1972-82.
197. Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Bio.* 2005, 77(5): 598-625.
198. Rath, M., I. Muller, P. Kropf, E.I. Closs, and M. Munder. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.* 2014, 5: 532.
199. Ellis, T.N. and B.L. Beaman. Interferon- γ activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology* 2004, 112(1): 2-12.
200. Khan, I.A., J.A. MacLean, F.S. Lee, L. Casciotti, E. DeHaan, J.D. Schwartzman, and A.D. Luster. IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunity* 2000, 12(5): 483-94.
201. Nelson, C.M., M.J. Herron, R.F. Felsheim, B.R. Schloeder, S.M. Grindle, A.O. Chavez, T.J. Kurtti, and U.G. Munderloh. Whole genome transcription profiling of *Anaplasma phagocytophilum* in human and tick host cells by tiling array analysis. *BMC Genomics* 2008, 9: 364.
202. Wang, X., Z. Cheng, C. Zhang, T. Kikuchi, and Y. Rikihisa. *Anaplasma phagocytophilum* p44 mRNA expression is differentially regulated in mammalian and tick host cells: involvement of the DNA binding protein ApxR. *J. Bacteriol.* 2007, 189(23): 8651-9.

203. Kim, H.Y., J. Mott, N. Zhi, T. Tajima, and Y. Rikihisa. Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in horses experimentally infected with *Anaplasma phagocytophila*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, 9(5): 1079-84.
204. Broxmeyer, H.E., B. Sherry, L. Lu, S. Cooper, K.-O. Oh, P. Tekamp-Olson, B. Kwon, and A. Cerami. Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood* 1990, 76(6): 1110-6.
205. Schall, T.J. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* 1991, 3(3): 165-83.
206. Schall, T.J., K. Bacon, R.D. Camp, J.W. Kaspari, and D.V. Goeddel. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1993, 177(6): 1821-6.
207. Taub, D.D., K. Conlon, A.R. Lloyd, J.J. Oppenheim, and D.J. Kelvin. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 1993, 260(5106): 355-8.
208. Maghazachi, A.A., A. Al-Aoukaty, and T.J. Schall. CC chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. *J. Immunol.* 1994, 153(11): 4969-77.
209. Hol, J., L. Wilhelmsen, and G. Haraldsen. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *J. Leuko. Biol.* 2010, 87(3): 501-8.
210. Scorpio, D.G., M. Akkoyunlu, E. Fikrig, and J.S. Dumler. CXCR2 blockade influences *Anaplasma phagocytophilum* propagation but not histopathology in the mouse model of human granulocytic anaplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004, 11(5): 963-8.
211. Cassatella, M.A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* 1999, 73: 369-509.
212. Gasperini, S., M. Marchi, F. Calzetti, C. Laudanna, L. Vicentini, H. Olsen, M. Murphy, F. Liao, J. Farber, and M.A. Cassatella. Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J. Immunol.* 1999, 162(8): 4928-37.
213. Kim, H.Y. and Y. Rikihisa. Roles of p38 mitogen-activated protein kinase, NF-kappaB, and protein kinase C in proinflammatory cytokine mRNA expression by human peripheral blood leukocytes, monocytes, and neutrophils in response to *Anaplasma phagocytophila*. *Infect. Immun.* 2002, 70(8): 4132-41.
214. Schindler, R., B. Clark, and C. Dinarello. Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 1990, 265(18): 10232-7.
215. Mocsai, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 2013, 210(7): 1283-99.
216. Banerjee, R., J. Anguita, and E. Fikrig. Granulocytic ehrlichiosis in mice deficient in phagocyte oxidase or inducible nitric oxide synthase. *Infect. Immun.* 2000, 68(7): 4361-2.

217. Tauber, A.I., N. Pavlotsky, J.S. Lin, and P.A. Rice. Inhibition of human neutrophil NADPH oxidase by *Chlamydia* serovars E, K, and L2. *Infect. Immun.* 1989, 57(4): 1108-12.
218. Sahney, N.N., B.C. Lambe, J.T. Summersgill, and R.D. Miller. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte function by *Legionella pneumophila* exoproducts. *Microb. Pathog.* 1990, 9(2): 117-25.
219. Vazquez-Torres, A. and F.C. Fang. *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes Infect.* 2001, 3(14-15): 1313-20.
220. Buchmüller-Rouiller, Y. and J. Mauël. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. *Infect. Immun.* 1987, 55(3): 587-93.
221. Choi, K.S. and J.S. Dumler. Early induction and late abrogation of respiratory burst in *A. phagocytophilum*-infected neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003, 990: 488-93.
222. Mott, J., Y. Rikihisa, and S. Tsunawaki. Effects of *Anaplasma phagocytophila* on NADPH oxidase components in human neutrophils and HL-60 cells. *Infect. Immun.* 2002, 70(3): 1359-66.
223. Cassatella, M., F. Bazzoni, R.M. Flynn, S. Dusi, G. Trinchieri, and F. Rossi. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J. Biol. Chem.* 1990, 265(33): 20241-6.
224. Chakravorty, D. and M. Hensel. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes. Infect.* 2003, 5(7): 621-7.
225. Tsikas, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007, 851(1): 51-70.
226. Tsikas, D., F.-M. Gutzki, S. Rossa, H. Bauer, C. Neumann, K. Dockendorff, J. Sandmann, and J.C. Frölich. Measurement of nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography–mass spectrometry and by the Griess assay: problems with the Griess assay—solutions by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1997, 244(2): 208-20.
227. Brovkovich, V., X.P. Gao, E. Ong, S. Brovkovich, M.L. Brennan, X. Su, S.L. Hazen, A.B. Malik, and R.A. Skidgel. Augmented inducible nitric oxide synthase expression and increased NO production reduce sepsis-induced lung injury and mortality in myeloperoxidase-null mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008, 295(1): L96-103.
228. Lehrer, R.I. and M.J. Cline. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection. *J. Clin. Invest.* 1969, 48(8): 1478-88.
229. Kutter, D. Prevalence of myeloperoxidase deficiency: population studies using Bayer-Technicon automated hematology. *J. Mol. Med. (Berl.)* 1998, 76(10): 669-75.
230. Marchetti, C., P. Patriarca, G.P. Solero, F.E. Baralle, and M. Romano. Genetic studies on myeloperoxidase deficiency in Italy. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2004, 57(5): S10-2.

231. Decleva, E., R. Menegazzi, S. Busetto, P. Patriarca, and P. Dri. Common methodology is inadequate for studies on the microbicidal activity of neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 2006, 79(1): 87-94.
232. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998, 92(9): 3007-17.
233. Tiden, A.K., T. Sjogren, M. Svensson, A. Bernlind, R. Senthilmohan, F. Auchere, H. Norman, P.O. Markgren, S. Gustavsson, S. Schmidt, S. Lundquist, L.V. Forbes, N.J. Magon, L.N. Paton, G.N. Jameson, H. Eriksson, and A.J. Kettle. 2-thioxanthines are mechanism-based inactivators of myeloperoxidase that block oxidative stress during inflammation. *J. Biol. Chem.* 2011, 286(43): 37578-89.
234. Aratani, Y., H. Koyama, S. Nyui, K. Suzuki, F. Kura, and N. Maeda. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect. Immun.* 1999, 67(4): 1828-36.
235. Klein, M.B., J.S. Miller, C.M. Nelson, and J.L. Goodman. Primary bone marrow progenitors of both granulocytic and monocytic lineages are susceptible to infection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J. Infect. Dis.* 1997, 176(5): 1405-9.
236. MacMicking, J., Q.-w. Xie, and C. Nathan. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997, 15(1): 323-50.
237. Bedard, K. and K.-H. Krause. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2007, 87(1): 245-313.
238. Denkers, E.Y. and B.A. Butcher. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.* 2005, 21(1): 35-41.
239. Ng, V.H., J.S. Cox, A.O. Sousa, J.D. MacMicking, and J.D. McKinney. Role of KatG catalase - peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol. Microbiol.* 2004, 52(5): 1291-302.
240. Jung, J.-Y., R. Madan-Lala, M. Georgieva, J. Rengarajan, C.D. Sohaskey, F.-C. Bange, and C.M. Robinson. The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria. *Infect. Immun.* 2013, 81(9): 3198-209.
241. Wei, X.Q., I.G. Charles, A. Smith, J. Ure, G.J. Feng, F.P. Huang, D. Xu, W. Muller, S. Moncada, and F.Y. Liew. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995, 375(6530): 408-11.
242. Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, P. Mastroeni, H. Ischiropoulos, and F.C. Fang. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J. Exp. Med.* 2000, 192(2): 227-36.
243. Dumler, J.S., N.C. Barat, C.E. Barat, and J.S. Bakken. Human granulocytic anaplasmosis and macrophage activation. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 45(2): 199-204.
244. Sturge, C.R., A. Benson, M. Raetz, C.L. Wilhelm, J. Mirpuri, E.S. Vitetta, and F. Yarovinsky. TLR-independent neutrophil-derived IFN-gamma is important for host resistance to intracellular pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2013, 110(26): 10711-6.
245. Solbach, W. and T. Laskay. The host response to *Leishmania* infection. *Adv. Immunol.* 2000, 74: 275-317.

246. Salgame, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr. Opin. Immunol.* 2005, 17(4): 374-80.
247. Singhal, A., A. Jaiswal, V.K. Arora, and H.K. Prasad. Modulation of gamma interferon receptor 1 by *Mycobacterium tuberculosis*: a potential immune response evasive mechanism. *Infect. Immun.* 2007, 75(5): 2500-10.
248. Bhardwaj, N., L.E. Rosas, W.P. Lafuse, and A.R. Satoskar. *Leishmania* inhibits STAT1-mediated IFN-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1beta by *Leishmania mexicana*. *Int. J. Parasitol.* 2005, 35(1): 75-82.
249. Bertholet, S., H.L. Dickensheets, F. Sheikh, A.A. Gam, R.P. Donnelly, and R.T. Kenney. *Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *Infect. Immun.* 2003, 71(4): 2095-101.
250. Imai, K., T. Kurita-Ochiai, and K. Ochiai. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection promotes SOCS induction and inhibits IFN-gamma-stimulated JAK/STAT signaling in J774 macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003, 39(2): 173-80.
251. Bussmeyer, U., A. Sarkar, K. Broszat, T. Lüdemann, S. Möller, G. van Zandbergen, C. Bogdan, M. Behnen, J.S. Dumler, F.D. von Loewenich, W. Solbach, and T. Laskay. Impairment of gamma interferon signalling in human neutrophils infected with *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect. Immun.* 2010, 78(1): 358-63.
252. Bonjardim, C.A., P.C. Ferreira, and E.G. Kroon. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immu*
253. Marchi, L., R. Sesti-Costa, M. Ignacchiti, S. Chedraoui-Silva, and B. Mantovani. In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: Increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. *Int. Immunopharmacol.* 2014, 18(2): 228-35.
254. Steinbeck, M.J., J.A. Roth, and M.L. Kaeberle. Activation of bovine neutrophils by recombinant interferon-gamma. *Cell. Immunol.* 1986, 98(1): 137-44.
255. Evans, T.J., L.D. Buttery, A. Carpenter, D.R. Springall, J.M. Polak, and J. Cohen. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93(18): 9553-8.
256. Yamashita, T., T. Uchida, A. Araki, and F. Sendo. Nitric oxide is an effector molecule in inhibition of tumor cell growth by rIFN-gamma-activated rat neutrophils. *Int. J. Cancer* 1997, 71(2): 223-30.
257. McCall, T.B., R.M. Palmer, and S. Moncada. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur. J. Immunol.* 1991, 21(10): 2523-7.

9 Publikationsverzeichnis

Vortrag und Poster:

Impact of antimicrobial effector mechanisms of in vitro generated murine neutrophils on the growth of *Anaplasma phagocytophilum*; Poster bei der 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Münster, September 2015

Impact of antimicrobial effector mechanisms of in vitro generated murine neutrophils on the growth of *Anaplasma phagocytophilum*; Vortrag bei der 27. Jahrestagung der American Society for Rickettsiology, CA, USA, Juni 2015.

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Georg Häcker danke ich für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Freiburg in Breisgau durchführen zu können. Ebenfalls danke ich ihm für die Korrektur und Begutachtung.

Herrn Prof. Dr. Lothar H. Wieler, seit März 2015 Präsident des Robert-Koch-Instituts, danke ich als meinem Erstgutachter für Betreuung, Korrektur und Begutachtung sowie für die vielen Anregungen und kritischen Gesprächen. Insbesondere danke ich ihm für die Freiheit, welche er mir während des gesamten Forschungsprojektes eingeräumt hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Friederike von Loewenich: Vielen Dank für die unermüdliche und geduldige Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden, insbesondere für die sehr zeitaufwendige Einführung in die Zellkulturarbeit! Ihre sachkundige und uneingeschränkte Unterstützung während meiner gesamten Promotionsphase trug maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Meinen Mitdoktoranden Markus Diebel, Christian Huhn, Beate Müller, Arne Westheider danke ich herzlich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die schöne Zeit im Labor und ihre stetige freundschaftliche Hilfsbereitschaft. Besonders Arne habe ich für das Korrekturlesen, die hilfreichen Diskussionen und die gemeinsamen Kaffeepausen zu danken!

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Friedrich Dreves für das sorgfältige Korrekturlesen.

Meinen Freunden danke ich für ihre Geduld, liebevolle Unterstützung und Aufmunterung während der stressigen Phasen. Besonders danke ich Michael Eisold, der mir während der Doktorarbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ein besonderer Dank geht an Eero Kuusisto für das Korrekturlesen und für die liebevolle und motivierende Unterstützung!

Schließlich und keineswegs zuletzt danke ich meinen Angehörigen ganz herzlich! Vor allem meine Eltern haben mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht und mich während meiner Doktorarbeit unermüdlich und vielseitig unterstützt.

11 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Kathrin Gussmann

Freiburg im Breisgau, den 15.05.2015