

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
Ludwigs-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

# *YERSINIA ENTEROCOLITICA* ALS ORALER LEBENDTRÄGERIMPfstoff:

CHARAKTERISIERUNG DER ZYTOTOXISCHEN T-ZELLANTWORT *EX VIVO*

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Brigitte Köhn

aus München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Rüssmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Adelbert Roscher  
PD. Dr. Florian Schödel

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. K. Panthel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2011

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

München, den 12.07.2010

# INHALT

Inhalt.....	I
Abkürzungen.....	V
A Einleitung.....	1
A.1 Einführung in die Vakzinierung.....	2
A.2 <i>Yersinia enterocolitica</i> $\Delta yopP$ als Lebendträgerimpfstoff.....	3
A.2.1 Klinisches Bild der Yersiniose.....	3
A.2.2 Pathogenese und Virulenz von <i>Y. enterocolitica</i> .....	4
A.2.3 Das Typ III Sekretionssystem und seine Verwendung in der Impfstoffentwicklung.....	7
A.3 Das Modellsystem <i>Listeria monocytogenes</i> .....	10
A.4 Die zelluläre Immunantwort.....	12
A.4.1 Komponenten des adaptiven Immunsystems.....	12
A.4.2 Das angeborene Immunsystem und Antigenpräsentation durch DCs.....	13
A.4.3 Phasen der CD8 <sup>+</sup> T-Zellantwort.....	16
A.4.4 Einflüsse von CD4 T <sub>H</sub> -Zellen auf die CD8 T-Zellentwicklung.....	17
A.4.5 Charakteristika antigenspezifischer CD8 T-Zellsubpopulationen.....	19
A.4.6 Differenzierungsmodelle der CD8 T-Zellantwort.....	21
A.5 Ziele der Arbeit.....	22
B Material und Methoden.....	23
B.1 Geräte.....	24
B.2 Verbrauchsmaterialien.....	25
B.3 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme.....	25
B.4 Puffer und Lösungen.....	26
B.5 Antikörper.....	27
B.6 Peptide.....	28

## Inhaltsverzeichnis

B.7	Tetramere.....	28
B.8	Mausstamm .....	28
B.9	Bakterienstämme und Plasmide .....	29
B.10	Nährmedien, Antibiotika, Anzucht und Stammhaltung.....	30
B.10.1	Nährmedien.....	30
B.10.2	Antibiotika.....	30
B.10.3	Anzucht und Stammhaltung.....	31
B.11	Ausdifferenzierung von murinem Knochenmark zu dendritischen Zellen (DCs).....	31
B.12	Proteinbiochemische Methoden .....	32
B.12.1	Isolierung von Proteinen .....	32
B.12.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) .....	34
B.12.3	Coomassie- Färbung .....	35
B.12.4	Immunoblot (Western Blot) nach Towbin (1979) .....	35
B.13	Mausinfektion und Organentnahme .....	36
B.13.1	Mauspassage und Herstellung von Aliquots .....	36
B.13.2	Immunisierung der Mäuse .....	36
B.13.3	Organentnahme zur Isolierung von Lymphozyten .....	37
B.13.4	Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut.....	38
B.14	<i>Listeria</i> Koloniebestimmung nach Belastungsinfektion.....	39
B.15	Virulenzversuche im Mausinfektionsmodell.....	39
B.16	Immunologische Methoden zur Funktionsanalyse von Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie.....	40
B.16.1	Immunfluoreszenzfärbung Für die Durchflusszytometrie .....	40
B.16.2	Bromdesoxyuridin (BrdU)- Färbung.....	42
B.16.3	In vivo Zytotoxizitätstest .....	43
B.17	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) .....	44
C	Ergebnisse .....	45

## Inhaltsverzeichnis

C.1	Der <i>Y. enterocolitica</i> pYV $\Delta$ yopP Impfstamm.....	46
C.2	Überprüfung der YopP Deletionsmutante mittels SDS-PAGE.....	48
C.3	T3SS-abhängige Sekretion der LLO-Hybridproteine <i>in vitro</i> .....	48
C.4	T3SS abhängige Translokation des LLO Hybridproteins.....	48
C.5	Nachweis LLO- und p60-spezifischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mittels Tetramer-Technologie .....	50
C.6	Schutzversuch.....	52
C.7	Charakterisierung der CD8 T-Zellantwort.....	53
C.7.1	Kinetik der CD8 <sup>+</sup> T-Zellexpansion.....	54
C.7.2	Bildung eines Immunologischen Gedächtnisses .....	55
C.7.3	Lokalisation der CD8-Subpopulationen.....	57
C.7.4	Bildung IFN $\gamma$ -produzierender CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	61
C.7.5	Effektorfunktion der CTLs <i>in vivo</i> .....	63
C.7.6	Proliferationsvermögen.....	64
C.8	Der Impfstamm <i>Y. enterocolitica</i> im Vergleich mit dem Impfstamm <i>S. typhimurium</i> .....	66
C.8.1	Der Impfstamm <i>S. typhimurium</i> .....	66
C.8.2	Virulenz im Mausmodell.....	67
C.8.3	Charakterisierung der CD8 T-Zellantwort.....	69
C.8.4	Schutzversuch.....	73
D	Diskussion .....	75
D.1	Die Rolle der Durchflusszytometrie in der Charakterisierung T-Zell basierender Impfstoffe .....	76
D.2	Der Impfstamm <i>Yersinia enterocolitica</i> $\Delta$ yopP induziert eine antigenspezifische CD8 T-Zellantwort <i>in vivo</i> .....	77
D.3	Immunisierung mit <i>Yersinia enterocolitica</i> $\Delta$ yopP (LLO) führt zur Bildung langlebiger Gedächtniszellen.....	79

## Inhaltsverzeichnis

D.4	Durch <i>Y. enterocolitica</i> $\Delta yopP$ (LLO) induzierte Phasen der T-Zellantwort und Quantitative Analyse .....	82
D.5	Funktionelle Charakterisierung der LLO <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	84
D.6	Einfluss der Yops auf die Immunantwort.....	86
D.7	Die Impfstämme <i>Yersinia</i> und <i>Salmonella</i> im Vergleich.....	88
E	Zusammenfassung .....	91
F	Literaturverzeichnis .....	93
	Mein besonderer Dank gilt .....	106

# ABKÜRZUNGEN

Ab	Antikörper ( <i>antibody</i> )
Abb.	Abbildungen
AEC	Aminoethylcarbazol
Ag	Antigen
Amp	Ampicillin
APC	Antigenpräsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> ) oder Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BALB/c	Bagg's Albino
BD	Becton Dickinson
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	Oberflächenantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt ( <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagle medium</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC50	effektive Konzentration um bei 50 % der Zellen eine Wirkung zu erzielen
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EMA	Ethidiumbromidmonoazid
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter ( <i>fluorescence activated cell sorter</i> )
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )



## Abkürzungen

FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GTP	Guanin-Triphosphat
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
i.p., i.v.	intraperitoneal, intravenös
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
KBE	Kolonie-bildende Einheit
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
LD <sub>50</sub>	letale Dosis für 50 % der Individuen
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitisvirus
Lk	Lymphknoten
Lsg.	Lösung
M	Mol pro Liter
<sup>M</sup> / <sub>V</sub>	Masse pro Volumen
mAb	monoklonaler Antikörper ( <i>monoclonal antibody</i> )
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mpl	<i>Listeria</i> Metalloprotease
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin-7
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid

## Abkürzungen

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Peyersche Plaques
rpm	<i>revolution per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zellrezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
T <sub>EC</sub>	Effektor T-Zellen
T <sub>EM</sub>	Effektor Gedächtnis T-Zellen ( <i>effector memory T cells</i> )
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T <sub>CM</sub>	Zentrale Gedächtnis T-Zellen ( <i>central memory T cells</i> )
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	<i>world health organisation</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
T3SS	Typ III Sekretionssystem
BCG	Bacille Calmette-Guérin
Yops	<i>Yersinia Outer Proteins</i>
pYV	<i>Yersinia</i> Virulenzplasmid
M-Zellen	<i>microfolded cells</i>
Ysc	<i>yersinia secretion system</i>
SptP	<i>Salmonella</i> Protein-Tyrosin-Phosphatase

# A EINLEITUNG

---

## A.1 EINFÜHRUNG IN DIE VAKZINIERUNG

Die Vakzinierung oder auch Schutzimpfung bezeichnet die aktive oder passive Immunisierung eines Menschen zum Aufbau eines Immunschutzes gegen einen bestimmten Krankheitserreger. Bei der aktiven Immunisierung bildet das adaptive Immunsystem des Körpers ein langlebiges immunologisches Gedächtnis, das vor Reinfektion bzw. vor dem Ausbruch der Krankheit schützt.

Der Einsatz von Impfstoffen ist die effektivste und kostengünstigste Präventionsmaßnahme der modernen Medizin (147). Ihr Einsatz führte, neben dem Einsatz von Antibiotika und der Verbesserung der Hygiene, zum Rückgang zahlreicher Infektionskrankheiten. Durch ein weltweites Impfprogramm („*Expanded Program on Immunization*“) hat die WHO die Immunisierungsrate gegen Diphtherie, Tetanus, Pertussis, Masern, Poliomyelitis und Tuberkulose bei Kindern seit 1974 von 5 % auf 80 % gesteigert, mit dem Ziel der weltweiten Bekämpfung und Eliminierung der verschiedenen Krankheitserreger (101). Die Pocken konnten 1979 weltweit als ausgerottet erklärt werden. Weitere Ziele sind die Eliminierung der Poliomyelitis – die 2001 das letztmal in Europa dokumentiert wurde – sowie der Rückgang von Infektionen durch Masern, Hepatitis und Gelbfieber (12;81;100;101).

Trotz dieser Erfolge sind Infektionskrankheiten immer noch die häufigste Todesursache weltweit. Für Infektionen, wie HIV und Malaria, stehen keine Impfstoffe zur Verfügung. Heute lizenzierte Impfstoffe richten sich gegen akute Infektionen und basieren auf einem antikörpervermittelten Schutz. Für intrazelluläre Mikroorganismen und chronische Infektionen, sowie für Tumorummunisierungen müssen Impfstoffe entwickelt werden, die neben dieser humoralen eine zellvermittelte Immunität bilden (100;148;156).

Es gibt verschiedene Arten neuartiger Impfstoffe, die eine zelluläre Immunantwort auslösen können. Dazu gehören attenuierte Lebendimpfstoffe, Lebendvektoren, DNA-Vakzine, heterologe Prime-Boost-Vakzine und Peptidvakzine (2;59;137). Des Weiteren gibt es Vakzine, die auf dem Einsatz von Dendritischen Zellen („*dendritic cell*“, DCs) basieren (59). All diese Vakzine sind in der Lage, eine zelluläre schutzvermittelnde T-Zellantwort auszulösen.

## A.2 *YERSINIA ENTEROCOLITICA* $\Delta$ YOPP ALS LEBENDTRÄGERIMPfstOFF

Eine vielversprechende neuartige Vakzinierungsstrategie ist der Einsatz oraler Lebendträgerimpfstoffe. Es handelt sich um rekombinante pathogene Bakterienstämme, die attenuiert sind und die genetische Information heterologer immunodominanter Antigene tragen (117;145). Die Attenuierung der Bakterienstämme erfolgt durch definierte Mutationen und hat eine eingeschränkte Fähigkeit zur Replikation zur Folge. Die Bakterien sind dadurch zu einer begrenzten Infektion fähig, die eine zelluläre Immunantwort auslöst (54). Die Immunantwort richtet sich dabei nicht nur gegen den Impfstamm selbst, sondern auch gegen das fremde Antigen. Immunisierungen mit oralen Lebendträgerimpfstämmen vermitteln Schutz vor Pathogenen, deren immunodominante Proteine von dem Impfstamm synthetisiert werden (54;137).

Neben der verbesserten Immunantwort sprechen aber auch andere Aspekte für den Einsatz oraler Lebendträgerimpfstoffe. Die Akzeptanz gegenüber Impfungen wird durch Vakzine mit nadelfreier Anwendung erhöht, was vor allem in Entwicklungsländern wichtig ist, um Impfprogramme effektiv durchführen zu können (111). Weitere wirtschaftliche Aspekte sind die kostengünstige Herstellung und der kostengünstige Transport (54).

Verschiedene genetisch modifizierte Bakterienstämme sind in der Literatur als Lebendträgerimpfstoffe beschrieben worden. Dazu gehören attenuierte Stämme von *Salmonella typhimurium* (145;152), *Mycobacterium tuberculosis* (BCG) (8;53), *Listeria monocytogenes* (64), sowie *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* (143;146).

### A.2.1 KLINISCHES BILD DER YERSINIOSE

*Y. enterocolitica* ist einer von drei humanpathogenen Vertretern der Gattung *Yersinia*, die zu den gramnegativen stäbchenförmigen *Enterobacteriaceae* gehört. Neben dem Erreger der Pest – *Y. pestis* – sind die beiden anderen enteropathogenen Arten *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* Auslöser lebensmittelbedingter gastrointestinaler Infektionen (84). Essentiell für die Virulenz der drei humanpathogenen Arten, ist das Vorhandensein eines 70 kb großen *Yersinia* Virulenzplasmids (pYV), welches für ein

Typ III Sekretionssystem (T3SS) und dessen Effektorproteine („*Yersinia outer proteins*“, Yops) kodiert (48).

*Y. enterocolitica* ist – mit etwa 6000 Infektionen pro Jahr – einer der häufigsten Enteritiserreger in Deutschland (73). Bei einer Infektion durch kontaminierte Lebensmittel oder durch Kontakt mit infizierten Tieren, kommt es zu einer Enteritis oder Enterokolitis mit wässrigem Durchfall, Erbrechen und Fieber. In seltenen Fällen kommt es zu einer mesenterialen Lymphadenitis, Sepsis oder als immunpathologische Spätfolge zu einer reaktiven Arthritis (127). In der Regel verläuft eine Yersiniose selbstlimitierend, kann aber bei Komplikationen mit Tetrazyklinen und Gyrasehemmern behandelt werden.

### A.2.2 PATHOGENESE UND VIRULENZ VON *Y. ENTEROCOLITICA*

#### A.2.2.1 Adhärenz und Invasion

*Y. enterocolitica* gelangt nach oraler Aufnahme in den Darm und bindet im terminalen Ileum an die in der Mukosa der Peyerschen Plaques gelegenen M-Zellen (s. Abbildung A 1 A). Diese Interaktion erfolgt durch das membrangebundene Invasin, das an den  $\beta$ 1-Integrinrezeptor der M-Zellen bindet und so die Internalisierung vermittelt (4;79;90). Auch das *Yersinia*-Adhäsion Yada kann die Bindung von *Y. enterocolitica* an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine, wie Kollagen, Fibronectin und Laminin vermitteln, und dadurch zur Internalisierung von *Yersinia* führen (57;79). Über die M-Zellen dringt *Y. enterocolitica* in das lymphatische Gewebe der Peyerschen Plaques ein, bildet extrazelluläre Mikroabszesse und ist dort in der Lage zu replizieren (68;71). Von den Peyerschen Plaques gelangen die Bakterien bei einem septischen Verlauf in die Lymphknoten, die Milz und die Leber (11;38).

#### A.2.2.2 Das T3SS und seine Effektorproteine

Das T3SS mit seinen Yops ist für das extrazelluläre Überleben von *Y. enterocolitica* im lymphatischen Gewebe essentiell.

T3SSs sind komplexe, aus über 20 Proteinen aufgebaute Transportsysteme pathogener gramnegativer Bakterien, die die Translokation von Effektorproteinen in das Zytosol eukaryontischer Zellen ermöglichen. Die translozierten Proteine sind Virulenzfaktoren, die eine Kolonisation des Wirtsorganismus ermöglichen (61;65;84).

Das T3SS von *Y. enterocolitica*, das Yop-Sekretionskomplex („*Yop Secretion complex*“, Ysc) oder auch Injektisom genannt wird, besteht aus einem Basalkörper, welcher die innere und äußere Bakterienmembran durchspannt, und einer „molekularen Nadel“ (YscF), die an der Bakterienoberfläche herausragt (s. Abbildung A 1 B). Die Bildung einer Translokationspore in der Wirtsmembran wird durch YopB und YopD, sowie LcrV vermittelt (48;61).

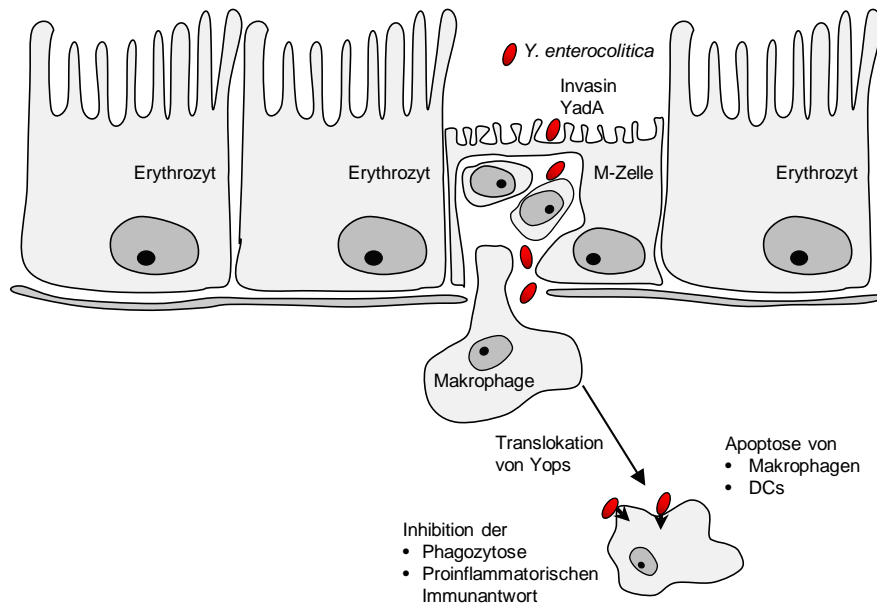
Sechs Yop Effektormoleküle (YopH, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT) werden über das T3SS in eukaryontische Zielzellen transloziert, wodurch sie die wirtseigene Immunantwort modulieren können, und somit das Überleben der Bakterien ermöglichen (49): Durch die Injektion von YopE, YopH, YopP und YopT ist *Y. enterocolitica* in der Lage, der Phagozytose durch Makrophagen und DCs zu entgehen (3;4). Für das Effektorprotein YopP wurde gezeigt, dass es Apoptose in Makrophagen und DCs induziert (10;58;121-123). Des Weiteren wird durch YopP, YopH und YopE die proinflammatorische Immunantwort unterdrückt (IL-2, IL-8, TNF $\alpha$ ), und somit das Eindringen von Monozyten und Neutrophilen verhindert (30;48;167).

Die Yops sind für die Virulenz von *Y. enterocolitica* essentiell. Yop-Deletionsmutanten zeigen eine verminderte Virulenz im Mausmodell. Für *Y. enterocolitica* Serovar 0:8 (Biotyp IB) Yop-Deletionsmutanten wurde im oralen C57BL6-Mausinfektionsmodell gezeigt, dass sie verschieden stark attenuiert sind, und in drei Gruppen eingeteilt werden können (164).  $\Delta yopH$ -,  $\Delta yopM$ - und  $\Delta yopQ$ -Mutantenstämme sind die am stärksten attenuierten Stämme und sind nicht in der Lage eine systemische Infektion hervorzurufen (164).  $\Delta yopP$ - und  $\Delta yopE$ -Mutanten dagegen sind schwach attenuiert, können die Milz und die Leber kolonisieren, werden aber aus dem Körper eliminiert und die Mäuse erholen sich von einer Infektion. Die  $\Delta yopO$ - und  $\Delta yopT$ -Deletionsmutanten zeigen keine Attenuierung im Mausmodell (164).

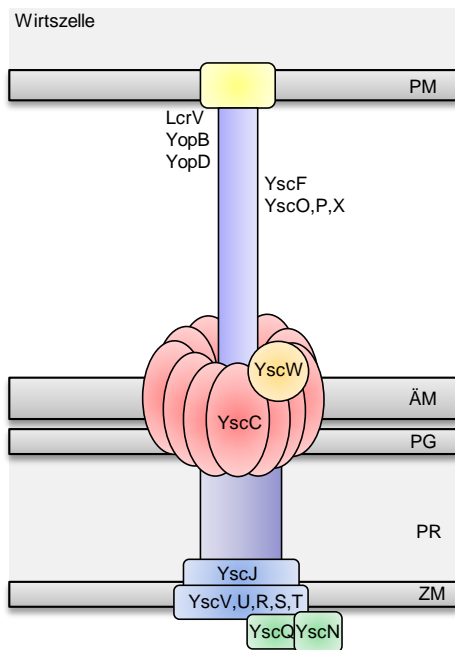
Dieses Phänomen machte man sich bei der Entwicklung eines *Yersinia*-basierten Impfstammes zu nutze. Für die schwach attenuierte *Y. enterocolitica* Serovar 0:8 (Biotyp IB)  $\Delta yopP$ -Mutante wurde gezeigt, dass sie im Gegensatz zu anderen Yop-Deletionsmutanten ( $\Delta yopH$ ,  $\Delta yopE$ ,  $\Delta yopM$  und  $\Delta yopQ$ , sowie  $\Delta yop$  Doppelmutanten) eine starke zelluläre, d.h. CD8 T-Zell-vermittelte Immunantwort im Mausmodell hervorruft, und somit als Lebendträgerimpfstamm eingesetzt werden kann (110;163).

## A Einleitung

(A)



(B)



### Abbildung A 1: Pathogenitätsfaktoren von *Yersinia enterocolitica*

(A) Infektionsverlauf:

*Y. enterocolitica* gelangt nach oraler Aufnahme in das terminale Ileum. Dort kommt es durch Interaktionen von YadA und Invasin mit den M-Zellen zur Internalisierung der Bakterien, wodurch sie ins lymphatische Gewebe der Peyerschen Plaques gelangen. Durch die Translokation der Yops, ist *Y. enterocolitica* in der Lage im extrazellulären Gewebe zu persistieren. Dazu wird zum einen die Phagozytose und die proinflammatorische Immunantwort inhibiert und zum anderen wird die Apoptose in Makrophagen und DCs induziert.

(B) Ysc Injektisom:

Das T3SS von *Y. enterocolitica* durchspannt als Basalkörper die Zytoplasmamembran (ZM), den periplasmatischen Raum (PR) mit der Petidoglykanschicht (PG) und die äußere Membran (ÄM). Der Ring durch die ÄM wird von dem Sekretin YscC und dem Lipoprotein YscW gebildet. Die Komponenten die in Kontakt mit der ZM sind, sind das Lipoprotein YscJ, sowie YscV, YscU, YscR, YscS und die ATPase YscN. Der Nadelkomplex, der hauptsächlich aus YscF besteht, bildet an seiner Spitze durch LcrV und YopB/D eine Pore in der Plasmamembran (PM) der Wirtszelle, durch die die Yop Effektorproteine transloziert werden.



### A.2.3 DAS TYP III SEKRETIONSSYSTEM UND SEINE VERWENDUNG IN DER IMPFSTOFF-ENTWICKLUNG

Bei dem Impfstamm *Y. enterocolitica* Serovar 0:8 (Biotyp IB)  $\Delta yopP$  wird das T3SS als Antigen-Mikroinjektionssystem genutzt, um eine zelluläre Immunantwort auszulösen (s. Abbildung A 2) (163;165). Das Prinzip T3SS-abhängiger Impfstämme beruht darauf, dass das T3SS in der Lage ist auch immunodominante heterologe Antigene in eukaryontische Zellen, insbesondere DCs, zu transportieren. Auf diese Weise werden die heterologen Antigene über den Antigenpräsentationsweg des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse I („major histocompatibility complex“, MHC) CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert und eine zytotoxische T-Zellantwort induziert (s. A.4.2) (82;89;145;146). Die Translokation der fremden Antigene wird durch bestimmte Typ III-Effektorproteine mit definierter Sekretions- und Translokationsdomäne, sogenannten Transportproteinen („carrier proteins“), vermittelt (142).

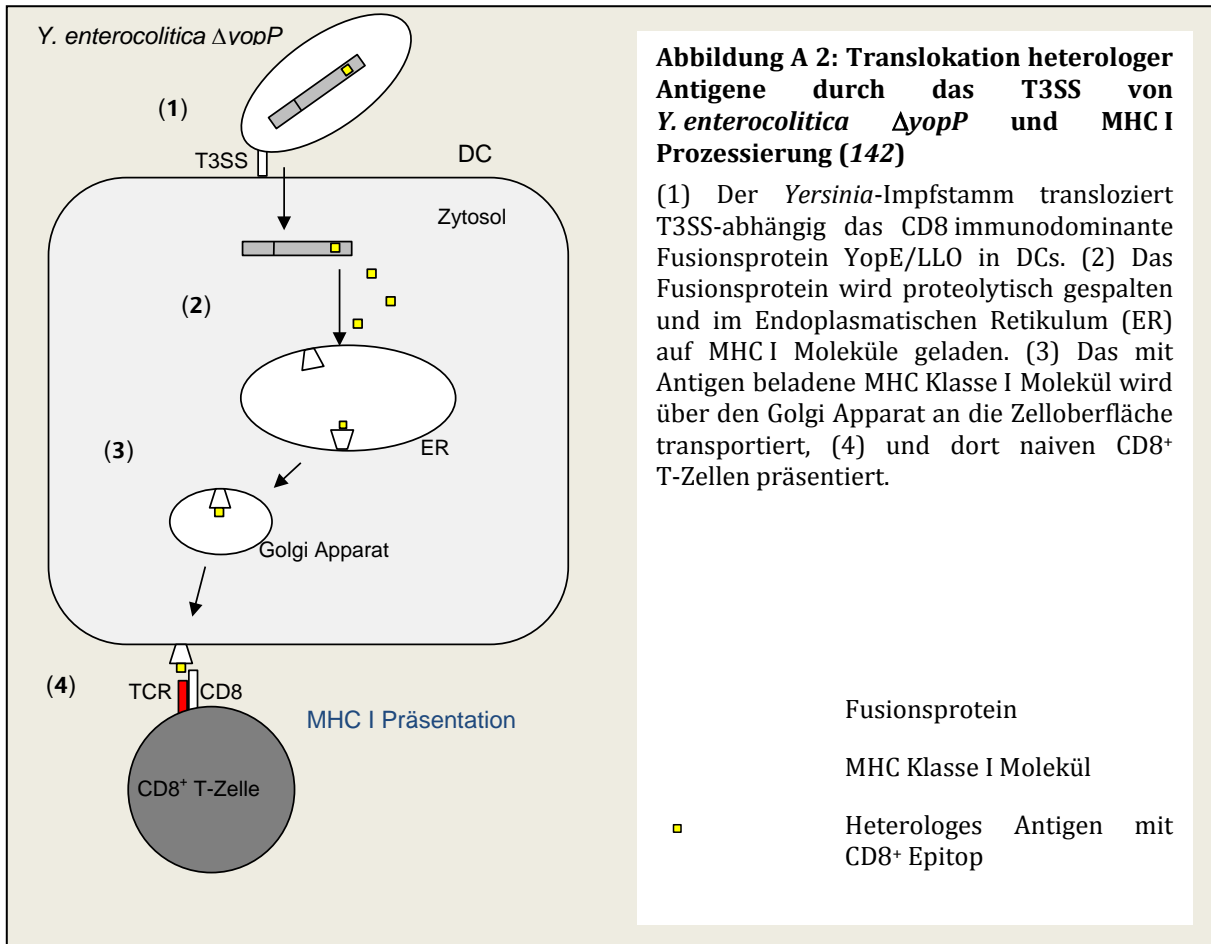
Rüssmann *et al.* zeigten erstmals, dass das T3SS des attenuierten *S. typhimurium* Stammes SB824 als Antigen-Mikroinjektionssystem genutzt werden kann (144). Ein Fusionsprotein, das aus dem Transportprotein SptP (*Salmonella* Protein-Tyrosin-Phosphatase) und dem immunodominanten CD8<sup>+</sup> Epitop (LCMVNP<sub>118-126</sub>) des LCMV Nukleoproteins (Lymphozytäres Choriomeningitisvirus, LCMV) besteht, wird in antigenpräsentierende Zellen („antigen presenting cells“, APC) transloziert, und über den MHC I-Weg präsentiert. Mäuse, die mit dem *S. typhimurium* Impfstamm, der LCMVNP<sub>118-126</sub> transloziert, immunisiert wurden, waren gegen eine Infektion mit LCMV geschützt (145). Da SptP aber nur die Translokation von kurzen Proteinfragmenten bis zu einer Länge von 45-55 Aminosäuren (AS) vermittelt, wurde ein Transportprotein gesucht, das die Translokation größerer Proteinfragmente ermöglicht.

Die Komponenten der T3SS sind aufgrund von horizontalem Gentransfer innerhalb der gramnegativen Bakterien funktionell stark konserviert (84). Daher können Effektorproteine anderer Spezies als Transportproteine in einem Impfstamm genutzt werden. YopE von *Y. enterocolitica* ist hierfür ein Beispiel (146). Das 25 kDa große Protein ist ein GTPase aktivierendes Typ III-Effektorprotein, das das Aktinzytoskelett eukaryontischer Zellen zerstört und somit die Phagozytose durch Makrophagen und DCs inhibiert (27;132;139;140). Die 11 - 15 AS lange Sekretions- sowie die 50 AS lange

Translokationsdomäne, die den Typ III-abhängigen Transport von YopE in eukaryontische Zellen vermittelt, liegen am aminoterminalen Ende des Proteins. Fusio- niert man AS 1 - 138 von YopE an > 300 AS-lange immunodominante Fragmente des Listerolysins O (LLO) oder der Mureinhydrolase p60 von *Listeria monocytogenes*, wird das Fusionsprotein in Anwesenheit des Chaperons SycE in das Zytoplasma von APCs translo- ziert und die antigenen Peptide werden auf dem MHC I-Weg prozessiert (146). *S. typhimurium* SB824 Impfstämme, die das Fusionsprotein YopE/LLO oder YopE/p60 translozieren, vermitteln protektiven Schutz gegenüber einer Listerieninfektion im Mausmodell (144).

Der Nachteil von *S. typhimurium* SB824 als Impfstamm ist sein Pathogenitätsprinzip, das es dem Immunsystem nicht möglich macht, den Erreger mittels Antikörpern und Kom- plement zu eliminieren, oder über den endozytotischen Weg zu prozessieren (104). *S. typhimurium* persistiert und repliziert intrazellulär in einem membranumhüllten Kompartiment, das auch Makropinosom oder SCV („*Salmonella containing vacuole*“) ge- nannt wird (1). Das Überleben in der SCV wird durch Effektorproteine vermittelt, die durch ein auf der Pathogenitätsinsel 2 („*Salmonella pathogenicity island*“, SPI) gelegenes T3SS in das Zytoplasma der Wirtszelle transloziert werden. Die Translokation heterologer Antigene durch den *Salmonella*-Impfstamm erfolgt dabei ebenfalls SPI 2-abhängig.

Wie in Kapitel A.2.2 beschrieben wurde, hat *Y. enterocolitica* eine extrazelluläre Lebens- weise. Von diesem extrazellulärem Standort aus ist es dem Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  möglich, das Fusionsprotein YopE/LLO T3SS-abhängig in DCs zu translozieren, und somit eine starke CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen das heterologe Antigen LLO zu induzieren (s. Abbildung A 2). Diese zytotoxische T-Zellantwort vermittelt Schutz vor einer Listerieninfektion (163;164). Verabreicht man Mäusen eine orale Dosis von 10<sup>8</sup> KBE (Kolonie-bildende Einheiten) *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  können die Bakterien bis an Tag 12 der Infektion aus Milz und Leber eliminiert werden (163;164). *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  ist somit ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung eines oralen Lebendträgerimpfstoffes.



### A.3 DAS MODELLSYSTEM *LISTERIA MONOCYTOGENES*

*L. monocytogenes* ist einer der Standardorganismen der Immunologie, und wurde sowohl zur Charakterisierung der angeborenen wie auch zur Charakterisierung der zytotoxischen T-Zellantwort im Mausmodell verwendet (50;129).

*L. monocytogenes* ist ein grampositives, stäbchenförmiges Bakterium, das Auslöser zahlreicher lebensmittelbedingter Infektionen und vor allem für Immunsupprimierte, Schwangere und Neugeborene gefährlich ist (50). Das klinische Bild der Listeriose reicht von einer Sepsis bis zur Meningitis und Meningoenzephalitis. Bei Schwangeren kommt es zur Chorioamnionitis und zur Infektion des Fetus, die zum Abort führen kann (129).

Nach oraler Aufnahme gelangt *L. monocytogenes* in den Gastrointestinaltrakt und bindet über Internalin A an E-Cadherin („*epithelial cadherin*“) der Epithelzellen (60). Auf diese Weise können die Bakterien die Epithelschicht durchwandern, und über den Blutkreislauf in andere Organe, wie die Milz und die Leber gelangen. *L. monocytogenes* ist in der Lage, in phagozytierende und nicht-phagozytierende Zellen einzudringen und intrazellulär zu replizieren. Die Fähigkeit der Bakterien in Enterozyten, Hepatozyten, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen einzudringen, macht es *Listeria* möglich, die Blut-Hirn-Schranke, sowie die Plazenta zu überwinden (69).

Nach aktiver oder passiver Internalisierung von *L. monocytogenes*, wird die Membran des Phagosoms durch die Sekretion des Zytotoxins LLO zerstört, wodurch *L. monocytogenes* ins Zytosol gelangt und dort zur Replikation fähig ist (129). Das Besondere von *L. monocytogenes* ist seine Mobilität. Durch ActA („*actin-assembly-inducing protein*“) ist es in der Lage, Aktin zu polymerisieren und sich durch diese polar lokalisierten Aktinpolymere im Zytosol zu bewegen und in Nachbarzellen zu gelangen (102).

Zur Bekämpfung einer systemischen Listerieninfektion wird zuerst das angeborene Immunsystem aktiviert. Diese frühe unspezifische inflammatorische Immunantwort ist für das Überleben des Wirtes essentiell (166). Hier spielen Neutrophile und Natürliche Killerzellen (NK), sowie der positive Einfluss von IL-1, IL-6, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ , eine entscheidende Rolle (129). Für die vollständige Beseitigung des Bakteriums ist jedoch eine späte spezifische CD8 T-Zellantwort nötig.

Die klassische MHC Klasse I-abhängige CD8 T-Zellantwort wird durch ins Zytosol sekretierte Proteine ausgelöst. Das porenbildende Zytotoxin LLO und die Mureinhydrolase

## A Einleitung

p60, die an der Zellteilung beteiligt ist, konnten als immunodominante Antigene identifiziert werden (129). In BALB/c Mäusen konnten die H-2K<sup>d</sup> MHC Klasse I-abhängigen Epitope LLO<sub>91-99</sub> und p60<sub>217-225</sub> identifiziert werden (130). Die durch diese immunodominanten Epitope ausgelöste CD8 T-Zellantwort wurde detailliert charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass LLO<sub>91-99</sub> spezifische CD8 T-Zellen alleine protektiven Schutz vermitteln (75).

Das Wissen über die CD8 T-Zellantwort macht diese Peptide zu hilfreichen Werkzeugen bei der Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach Immunisierungen mit neuartigen Lebendträgerimpfstoffen.

## A.4 DIE ZELLULÄRE IMMUNANTWORT

Bei der Entwicklung neuartiger Impfstoffe ist die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen („*Cytotoxic T cell*“, CTL), die gegen intrazelluläre Bakterien wirksam sind und die Bildung eines T-Zellgedächtnisses das wichtigste Ziel. Dazu muss der Impfstoff verschiedene Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems induzieren, um eine effektive T-Zellantwort auslösen zu können (100).

### A.4.1 KOMPONENTEN DES ADAPTIVEN IMMUNSYSTEMS

Bei der adaptiven Immunantwort wird zwischen humoraler und zellvermittelter Immunität unterschieden. Die humorale Immunantwort bezeichnet die antikörpervermittelte Immunität. Die aus Immunglobulinen aufgebauten Antikörper binden an exponierte Epitope intakter Moleküle und vermitteln die Abwehr von extrazellulären Erregern und Toxinen. Kurz- und langlebige antikörpersezernierende Plasmazellen („*long-lived plasma cells*“, LLPCs), sowie Gedächtnis B-Zellen („*Memory B-cells*“, MBCs), sind für die Produktion von Antikörpern und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses verantwortlich (99).

Die zellvermittelte Immunantwort und die Abwehr intrazellulärer Erreger wird von T-Zellen vermittelt. Bei ihrer Entwicklung im Thymus differenzieren T-Lymphozyten zu CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, oder auch CTLs genannt, erkennen und inhibieren infizierte Zellen und Tumorzellen und zerstören diese. CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, oder auch T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) genannt, sind durch die Produktion verschiedener Zytokine an der Aktivierung der zellulären (T<sub>H</sub> 1) sowie der humoralen (T<sub>H</sub> 2) Immunantwort beteiligt (136). Eine weitere Klasse der T-Zellen sind regulatorische T-Zellen („*Regulatory T cell*“, Treg), welche CD8 oder CD4 exprimieren können (93). Tregs sind für die Regulation des adaptiven Immunsystems zuständig und sind in der Lage, die T-Zellproliferation zu unterdrücken (161). Zusätzlich wurde eine wichtige Rolle bei der Generierung des immunologischen Gedächtnisses beschrieben (20;94).

Charakteristisch für das adaptive Immunsystem sind seine antigenspezifischen Rezeptoren, die sogenannten B-Zellrezeptoren („*B cell receptors*“, BCR) und T-Zellrezeptoren („*T cell receptors*“, TCR). Jeder Lymphozyt verfügt über einen einmaligen antigenspezifischen

schen Rezeptor, der körperfremde Strukturen erkennt und daraufhin die Zelle aktiviert. Dieses große Repertoire antigenspezifischer Rezeptoren wird durch rekombinatorische Umlagerung spezieller Gensegmente erreicht. Wird ein Antigen erkannt, kommt es zur klonalen Expansion, Eliminierung des pathogenen Organismus, und in Folge zur Bildung eines langjährigen immunologischen Gedächtnisses dieser antigenspezifischen Zellen (47).

Die Induktion des immunologischen Gedächtnisses ist das wichtigste Ziel einer Vakzination. Per Definition ist das immunologische Gedächtnis eine Immunantwort, die auch noch in Abwesenheit des Antigens andauert, und bei sekundärem Antigenkontakt eine schnellere und stärkere Immunantwort auslöst. Grundlegend setzt es sich aus antigenspezifischen LLPCs und MBCs, sowie CD4 und CD8 Gedächtniszellen zusammen (100). Charakteristisch ist, dass LLPCs auch nach Abklingen der Infektion weiterhin für Jahre neutralisierende Antikörper bilden. Diese Antikörper zirkulieren im Körper und sind für einen frühen Schutz nach Reinfektion verantwortlich (99). T-Gedächtniszellen erlangen, im Gegensatz zu den LLPCs, nur in Anwesenheit eines Antigens Effektorfunktionen. Dieses Antigen dient sozusagen als Schalter eines „An-Aus“-Mechanismus („*on-off lifestyle*“) (99).

### A.4.2 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM UND ANTIGENPRÄSENTATION DURCH DCs

Das angeborene Immunsystem, bestehend aus Komplement- und Interferonsystem, natürlichen Killerzellen und den phagozytierenden Zellen, wie den DCs, Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten, ist neben der ersten direkten Abwehr von Pathogenen, für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort verantwortlich (105). Die T-Zell-vermittelte Immunantwort beginnt mit der Erkennung „denaturierter, ungefalteter, sequentieller Abschnitte“ von Proteinen (63). Antigenspezifische-TCRs erkennen diese Peptide nur an der Peptid-Bindungsstelle von Oberflächenproteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes („*major histocompatibility complex*“, MHC). Diese Präsentation von Antigenen durch MHC-Moleküle erfolgt durch Antigenpräsentierende Zellen („*antigen presenting cells*“, APC), insbesondere durch DCs des angeborenen Immunsystems.

## A Einleitung

Entsprechend ihrer Bedeutung im Immunsystem wird zwischen verschiedenen DC-Subpopulationen, die unterschiedliche Aufgaben übernehmen, unterschieden (59;158). Konventionelle DCs („*conventional DC*“, cDC) beinhalten Langerhans-Zellen und interstitielle DCs, die im Epithel bzw. peripheren Gewebe patroulieren (39); Plasmacytoide DCs (pDC) produzieren nach Antigenkontakt Typ I-Interferone und sind starke Induktoren der zytotoxischen Immunantwort (116); IFN $\gamma$ -produzierende Killer-DCs (IKDC) sind in der Lage, Apoptose von Zellen zu induzieren (153).

Bei der Antigenpräsentation unterscheidet man zwischen der Prozessierung endogener und exogener Antigene. MHC Klasse I-Moleküle präsentieren Antigene endogener Proteine, wie intrazelluläre Bakterien oder Viren (92). Die Antigenpräsentation erfolgt in mehreren Schritten: Intrazelluläre antigene Peptide werden erkannt, mit Ubiquitin zum Abbau markiert und durch das Proteasom in Peptide gespalten. Danach werden die Peptide über den mit Antigenprozessierung-assoziierten-Transporterkomplex („*Transporter associated with antigen processing*“, TAP Komplex) ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo sie an MHC I-Moleküle gebunden werden. Dieser MHC I/Peptid-Komplex wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Hier treffen sie auf spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (168). Ein wesentliches Merkmal von MHC I-Molekülen ist, dass sie nicht nur auf APCs, sondern auf allen Zelltypen vorkommen, um antigene Peptide von infizierten Zellen CTLs zum Abbau zu präsentieren.

MHC Klasse II-Moleküle kommen nur auf APCs vor und präsentieren Peptide, die im extrazellulärem Milieu durch Phagozytose aufgenommen wurden (exogene Antigene) (33). MHC II-Moleküle werden im ER synthetisiert und im Endolysosom mit Antigen beladen. Das Endolysosom entsteht aus der Fusion von Phagosom, durch das Antigene aufgenommen werden, und dem Lysosom, in dem sich die MHC II-Moleküle befinden. Nachdem die MHC II-Moleküle beladen wurden, werden sie zur Oberfläche transportiert und präsentieren die Antigene CD4 T-Zellen (168).

Neben dem klassischen endogenen und exogenen Weg der Antigenpräsentation, gibt es zwei weitere Möglichkeiten Antigene auf MHC-Moleküle zu laden. Kürzlich wurde die sogenannte Autophagozytose („*Autophagy*“) beschrieben, die normalerweise eine Rolle bei der Homeostase der Zelle spielt. Durch Autophagozytose werden endogene Antigene, wie z.B. sich im Zytoplasma oder Phagosom befindende Viren, Bakterien oder Parasiten, auf dem MHC II-Weg präsentiert (168;175);(151). Eine weitere Art der



Antigenprozessierung ist die Kreuzpräsentation („*Cross-presentation*“) (22;23). Antigene Peptide von intrazellulären Pathogenen, die DCs nicht direkt infizieren, werden von DCs aus dem extrazellulärem Bereich aufgenommen und auf MHC I-Moleküle geladen.

Das angeborene Immunsystem nimmt außerdem durch die Aktivierung von extra- oder intrazelluläre Mustererkennungsrezeptoren („*pattern recognition receptors*“, PRRs), wie den *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) und den *Nod-like* Rezeptoren (NLRs) Einfluss auf die T-Zellantwort. PRRs binden mikrobielle Komponenten, sogenannte pathogenassoziierte molekulare Muster („*pathogen-associated molecular patterns*“, PAMPs). Das sind konservierte Bereiche, die unverändert in Mikroorganismen vorkommen, wie Lipopolysaccharide, die von TLR4 (134;157) erkannt werden, Flagellin (TLR5) (76), gering methylierte GC-reiche DNA (TLR9) (80;103) oder Muramyldipeptide (NOD1) (40). Durch die Aktivierung verschiedener PRRs werden unterschiedliche Signalwege ausgelöst. DCs exprimieren daraufhin unterschiedliche co-stimulatorische Moleküle und sekretieren unterschiedliche Zytokine, die die Art der adaptiven Immunantwort beeinflussen (6;100). Es wurde gezeigt, dass Antigene, die mit TLR4 einen Komplex bilden und über DCs präsentiert werden, T-Zellen besser aktivieren können, als das Antigen allein (28;29).

Ein Impfstoff muss die PRRs des angeborenen Immunsystems aktivieren, um eine effektive adaptive Immunantwort auszulösen. Durch den Einsatz von Adjuvantien können PRRs gezielt aktiviert werden und so die Immunantwort in eine bestimmte Richtung gelenkt werden (136). Der Einsatz von Lebendträgerimpfstoffen stimuliert verschiedene Arme des Immunsystems gleichzeitig, und induziert somit effektiv eine zelluläre Immunantwort (100).

### A.4.3 PHASEN DER CD8<sup>+</sup> T-ZELLANTWORT

Die primäre CD8 T-Zellantwort wird bei einer akuten Infektion in vier Phasen unterteilt (s. Abbildung A 3 A): (i) die Aktivierung, (ii) die Expansion, (iii) die Kontraktionsphase und (iv) die Gedächtnisphase (74;98). Verschiedene Faktoren beeinflussen dabei die Entwicklung der CD8 T-Zellsubpopulationen, insbesondere der Gedächtniszellen, und müssen somit bei der Entwicklung von Impfstoffen berücksichtigt werden (120;172).

Die Aktivierung von CD8 T-Zellen erfolgt in den sekundären lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten und der Milz, durch Kontakt mit DCs (74). DCs nehmen körperfremde Antigene im Gewebe in Folge eines Infektes oder einer Vakzinierung auf, reifen zu einer APC heran, exprimieren co-stimulatorische Moleküle, produzieren Zytokine und wandern zu sekundären lymphatischen Organen, wo sie den MHC I:Ag-Komplex den spezifischen TCRs der T-Zellen präsentieren (74). Der TCR ist aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die als Heterodimer antigene Strukturen erkennen kann, und dem CD8-Corezeptor aufgebaut. Zusätzlich ist eine CD3 Kette assoziiert, die intrazelluläre Signalkaskaden auslöst (s. Abbildung A 3 B) (7).

Der Kontakt zwischen TCR und MHC I:Ag-Komplex ist ein entscheidender Schritt in der T-Zellaktivierung. Dabei können stabile und kurzlebige Kontakte entstehen, die unterschiedliche T-Zellsubpopulationen zur Folge haben (31). Der Bereich dieses Zellkontakts zwischen DC und T-Zelle wird immunologische Synapse genannt (s. Abbildung A 3 B) (125;131). An dieser Verbindungsstelle kommt es neben dem Kontakt von TCR und MHC I:Ag-Komplex zu Interaktionen zwischen den co-stimulatorischen Molekülen CD28-CD80 und CTLA4-CD80 („*Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*“, CTLA-4), die die Art der Bindung und die Stärke des TCR-Signals beeinflussen (55;56;85).

Im Ganzen sind es drei Signale während der Aktivierung die Einfluss auf die T-Zellentwicklung haben (s. Abbildung A 3 C): Antigen (Signal 1), Co-Stimulation (Signal 2) und pro-inflammatorische Zytokine (IL-12, IFN $\gamma$ ) (Signal 3) (74;133). Diese Signale beeinflussen die Expansion, die Effektorfunktionen, die Kontraktionsphase, sowie die Entwicklung von langlebigen Gedächtniszellen (172).

Der Aktivierung folgt eine proliferative klonale Expansion und Differenzierung zu CD8 Effektorzellen, den CTLs, die in das periphere Gewebe wandern, und dort die Infektion bekämpfen und infizierte Zellen zerstören (98). Die T-Effektorzellen

(„Effector T cells“, T<sub>EC</sub>) stellen während der Expansion die dominante Subpopulation dar, die zytotoxische Funktionen vermittelt. Aus einer Zelle können innerhalb von 5-8 Tagen bis zu 10.000 Tochterzellen entstehen (74). Für die Infektion mit LCMV wurde gezeigt, dass sich CD8 T-Zellen um das 3.000-fache vermehren, und dabei mit einer Rate von 6-10 h pro Teilung durch 15 Zellteilungen gehen (124).

In der Kontraktionsphase geht die Anzahl der pathogenspezifischen CD8 T-Zellen unabhängig von der Eliminierung des pathogenen Organismus um 90 – 95 % zurück. (15). Die verbleibenden antigenspezifischen CD8 T-Zellen sind Gedächtniszellen. In Labormäusen konnten sie ein Leben lang nachgewiesen werden (83).

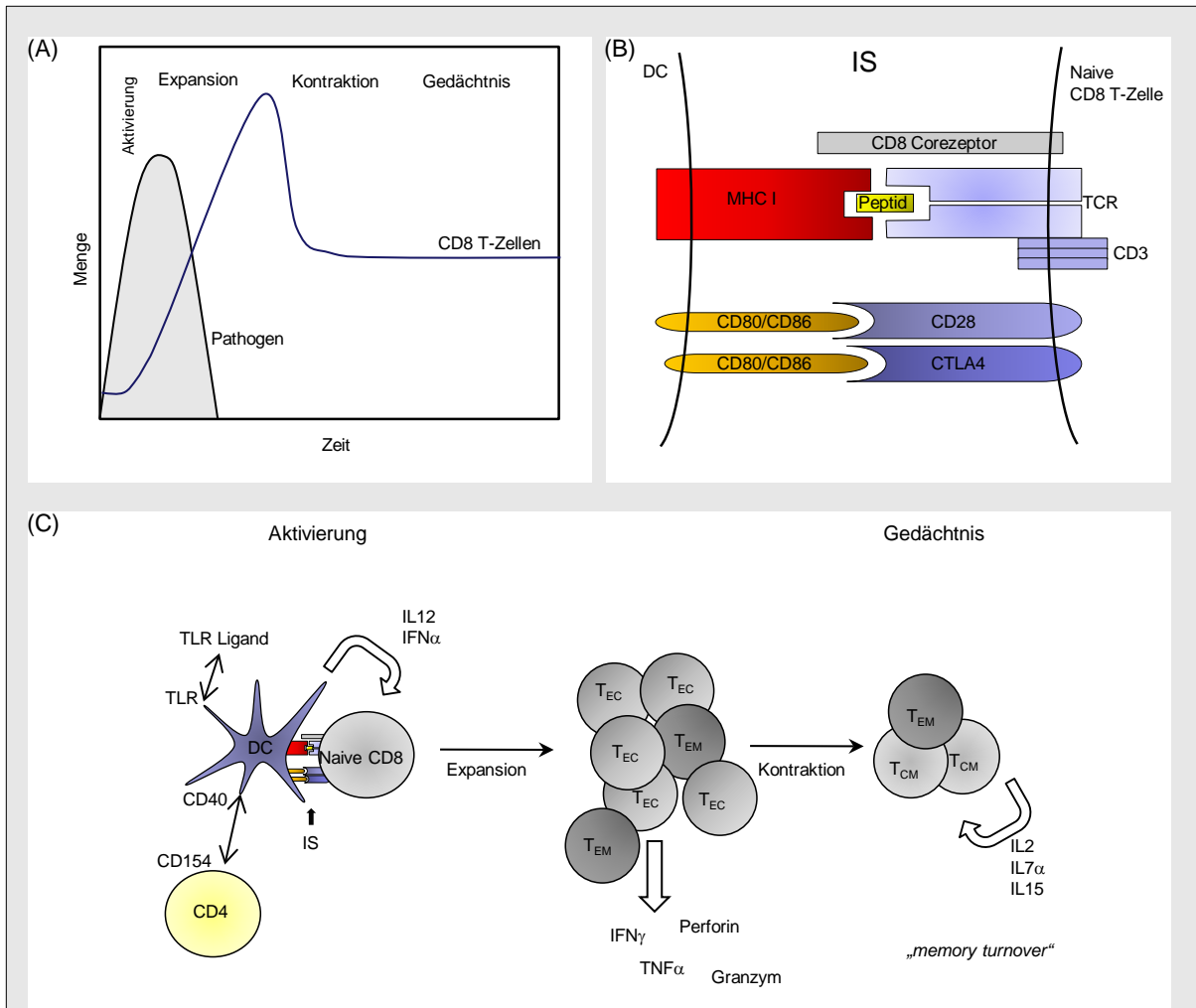
### A.4.4 EINFLÜSSE VON CD4 T<sub>H</sub>-ZELLEN AUF DIE CD8 T-ZELLENTWICKLUNG

Neben den bereits beschriebenen Signalen (1) Antigen, (2) Co-stimulatorische Moleküle und (3) proinflammatorisches Milieu beeinflussen CD4 T-Helferzellen die CD8 T-Zellentwicklung. Die Mechanismen, die dabei eine Rolle spielen, sind jedoch noch weitgehend ungeklärt (172).

CD4 T<sub>H</sub>-Zellen stimulieren über CD40-CD40L (CD154)-Interaktionen DCs und verstärken auf diese Weise die MHC-Expression (21;24;74). Durch die fehlende Hilfe von CD4 T<sub>H</sub>-Zellen werden funktionell inaktive Gedächtniszellpopulationen generiert (160;173). Die primäre Expansion und Entwicklung in T-Effektorzellen kann zwar unabhängig von CD4 T<sub>H</sub>-Zellen stattfinden, die antigenabhängige sekundäre Proliferation der Gedächtniszellen ist jedoch gestört (91).

Zusätzlich regulieren CD4 T<sub>H</sub>-Zellen die Expression des TRAIL-Rezeptors („TNF-related apoptosis-inducing ligand“, TRAIL) auf CD8 T-Zellen, der die Apoptose von Zellen induziert. Daneben wird über den Einfluss von IL-2 diskutiert, welches von CD4 T<sub>H</sub>-Zellen produziert wird und an CD25 sowie CD125 bindet. In CD25-defizienten CD8 T-Zellen kommt es zu einer anormalen sekundären Immunantwort (174). IL-2 wird als wichtiges Signal zur Entwicklung von CD8 T-Gedächtniszellen gesehen (74).

## A Einleitung



**Abbildung A 3: Phasen der CD8 T-Zellentwicklung bei einer akuten Infektion**

(A) Die CD8 T-Zellentwicklung ist in 4 Phasen unterteilt: die Aktivierung, die T-Zellexpansion, die Kontraktionsphase und die Gedächtnisphase. Nach der Aktivierung einer spezifischen CD8 T-Zelle kommt es zur klonalen Expansion, in der bis zu 1000 Tochterzellen aus einer Zelle entstehen. In der danach folgenden Expansionsphase geht die Anzahl der spezifischen T-Zellen um 90-95 % zurück. Es verbleiben langlebige Gedächtniszellen.

(B) Die Aktivierung der CD8 T-Zellen erfolgt durch MHC I:Ag-präsentierende DCs. In der immunologischen Synapse (IS) kommt es zum Kontakt zwischen MHC I:Ag und TCR sowie zum Kontakt von co-stimulatorischen Oberflächenmolekülen. Diese Interaktionen spielen eine wichtige Rolle bei der Generierung der T-Zellantwort und der Bildung von Gedächtniszellen.

(C) Die Phasen der T-Zellentwicklung haben verschiedene Charakteristika. Während der Aktivierung beeinflussen drei Faktoren (Signal 1: Antigen, Signal 2: Co-Stimulation und Signal 3: proinflammatorisches Milieu) die Bildung von Gedächtniszellen. Des Weiteren wird der Einfluss von CD4 T<sub>H</sub>-Zellen zur Bildung funktionsfähiger Gedächtniszellen benötigt. Die Aktivierung verschiedener TLRs führt zu unterschiedlichen Immunantworten. Die Expansionsphase ist durch das Vorhandensein von Effektorzellen gekennzeichnet, die über verschiedene Mechanismen infizierte Zellen zerstören und die Infektion bekämpfen (Perforin, Granzym, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ). In der Gedächtnisphase sind hauptsächlich T<sub>CM</sub>-Zellen vorhanden. Durch homeostatische Proliferation und regulierenden Zelltod („memory turnover“) wird diese Gedächtniszellpopulation aufrechterhalten.

DC: dendritische Zellen; IS: immunologische Synapse; T<sub>EC</sub>: T-Effektorzellen; T<sub>EM</sub>: Effektorgedächtniszellen; T<sub>CM</sub>: Zentrale Gedächtniszellen; TCR: T-Zellrezeptor; TLR: Toll-like Re-

#### A.4.5 CHARAKTERISTIKA ANTIGENSPEZIFISCHER CD8 T-ZELLSUBPOPULATIONEN

Die antigenspezifische CD8 T-Zellpopulation ist eine heterologe Gruppe von Zellen. Sie setzt sich aus CD8 T-Effektorzellen („*Effector T cells*“, T<sub>EC</sub>) sowie den zwei CD8 T-Gedächtniszellsubpopulationen, den Effektorgedächtniszellen („*Effector memory T cells*“, T<sub>EM</sub>) und Zentralen Gedächtniszellen („*Central memory T cells*“, T<sub>CM</sub>) zusammen (149). Die Subpopulationen sind durch unterschiedliche phänotypische und funktionelle Merkmale gekennzeichnet, und haben unterschiedliche Aufgaben im Schutz vor Infektionen (s. Tabelle A 1).

Die T<sub>EC</sub>-Subpopulation vermittelt Effektorfunktionen und ist im peripheren Gewebe, bzw. am Ort der Infektion lokalisiert. Über den Granula-Exozytose-Weg wird Perforin bzw. Granzym sekretiert, das zur Lyse bzw. zur Apoptose der infizierten Zelle führt (44). Des Weiteren kann Apoptose über den FasL/Fas-Mechanismus vermittelt werden (42). Zusätzlich werden durch die Produktion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  weitere antimikrobielle Effektorfunktionen vermittelt (155).

T<sub>EM</sub>-Zellen sind im peripheren nicht-lymphatischen Gewebe lokalisiert. Bei Antigenkontakt sind sie durch sofortige Effektorfunktion, jedoch durch nur schwache antigenabhängige Proliferationsfähigkeit charakterisiert (115;149).

T<sub>CM</sub>-Zellen sind im lymphatischen Gewebe lokalisiert, haben keine Effektorfunktionen und sind zu homeostatischer und antigenabhängiger Proliferation fähig (67;95). Der Erhalt der Gedächtniszellpopulation ist ein dynamischer Prozess, der als „*memory turnover*“ bezeichnet wird. Dieser ist durch homeostatische Proliferation und regulierendem Zelltod gekennzeichnet, welche über die Produktion von IL-2, IL-7 $\alpha$  und IL-15 gesteuert werden (67;169).

Den CD8-Subpopulationen konnten im Mensch und in der Maus verschiedene Kombinationen an Oberflächenmarkern zugewiesen werden, so dass eine phänotypische Identifikation der Subpopulationen möglich ist (s. Tabelle A 1). Im Menschen können antigenspezifische CD8 T-Zellsubpopulationen durch Kombination der Oberflächenmarker CCR7 und CD62L, oder den CD45-Isoformen („*leukocyte common antigen*“) bestimmt werden (25;149). In der Maus wurden die Kombination von CD127 und CD62L beschrieben (14;86). CCR7 und CD62L (L-Selektin) sind „*homing*“-Rezeptoren und für die

Wanderung der Zellen in lymphatisches Gewebe verantwortlich (32). CD127 ist der IL-7-Rezeptor und für die homeostatische Proliferation der Zellen notwendig (135).

**Tabelle A 1: Die antigenspezifischen CD8 T-Zellsubpopulationen und ihre phänotypischen und funktionellen Eigenschaften (88;137)**

CD8	Humane Marker	Murine Marker	Funktionelle Eigenschaften
<b>T<sub>naiv</sub></b>	CD45RA <sup>+</sup>		
	CCR7 <sup>+</sup>	CD127 <sup>+</sup>	– In lymphatischen Organen
	CD62L <sup>+</sup>	CD62L <sup>+</sup>	
<b>T<sub>EC</sub></b>	CD45RA <sup>-</sup>		– In peripheren Organen
	CCR7 <sup>-</sup>	CD127 <sup>-</sup>	– Sofortige Effektorfunktion
	CD62L <sup>-</sup>	CD62L <sup>-</sup>	– Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , Perforin, Granzym
			– Keine Fähigkeit zur Proliferation
<b>T<sub>EM</sub></b>	CD45RA <sup>+</sup> oder CD45RO <sup>+</sup>		– In peripheren Organen
	CCR7 <sup>-</sup>	CD127 <sup>+</sup>	– Sofortige Effektorfunktion
	CD62L <sup>-</sup>	CD62L <sup>-</sup>	– Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , Perforin, Granzym
			– Geringe Fähigkeit zur Proliferation
<b>T<sub>CM</sub></b>	CD45RA <sup>+</sup> oder CD45RO <sup>+</sup>		– In lymphatischen Organen
	CCR7 <sup>+</sup>	CD127 <sup>+</sup>	– Homeostatische Proliferation
	CD62L <sup>+</sup>	CD62L <sup>+</sup>	– Antigenabhängige Proliferation
			– Keine Effektorfunktionen
			– Produktion von IL-2

#### A.4.6 DIFFERENZIERUNGSMODELLE DER CD8 T-ZELLANTWORT

Wie sich die drei Subpopulationen ( $T_{EC}$ ,  $T_{EM}$  und  $T_{CM}$ ) aus einer naiven CD8 T-Zelle entwickeln, ist nicht exakt geklärt (87;88). Zwei widersprüchliche Differenzierungsmodelle wurden in der Literatur beschrieben (5;88;98).

Das lineare Differenzierungsmodell beschreibt die geradlinige Entwicklung einer naiven T-Zelle zu  $T_{EC}$ -Zellen, weiter zu  $T_{EM}$ -Zellen und  $T_{CM}$ -Zellen (97;169). Das wird durch neueste Untersuchungen bestätigt, die *in vivo* zeigen, dass antigenabhängig-proliferierende Gedächtniszellen von  $T_{EC}$ -Zellen abstammen (19).

Das progressive Differenzierungsmodell geht von einem komplexeren Entwicklungsprozess aus (66;107). Nach der Programmierung durch die Signale während der Aktivierungs- und Expansionsphase läuft die Differenzierung der T-Zellen unabhängig von weiterem Antigenkontakt ab (16;96;118). Dieses Signal ist definiert durch die Affinität zwischen TCR und MHC/Peptid, der Antigenkonzentration, sowie dem Vorhandensein co-stimulatorischer Moleküle und Zytokine (s. Kapitel A 4.3). Bei einem starken Signal entwickeln sich  $T_{EC}$ -Zellen, bei einem Signal mittlerer Stärke  $T_{EM}$ -Zellen, und bei einem schwachen Signal  $T_{CM}$ -Zellen (66;107). In diesem Modell ist es möglich, dass bereits in der frühen Phase der Immunantwort CD8 Gedächtniszellen gebildet werden (159). Dabei gibt es zwei Modelle, die die Entwicklung der naiven CD8 T-Zelle nach Antigenkontakt beschreiben. Es wurde gezeigt, dass sich aus der naiven CD8 T-Zelle zuerst eine intermediäre T-Zellpopulation ( $T_{im}$ ,  $CD127^+$ ,  $CD62L^-$ ) entwickelt, aus der sowohl Effektor-, als auch Gedächtniszellen entstehen (14;87). Das andere Modell zeigt, dass die naive T-Zelle eine asymmetrische Proliferation vollzieht, die zur Bildung von Effektor- und Gedächtniszellen führt (41).

## A.5 ZIELE DER ARBEIT

Die Bildung einer langlebigen CD8 T-Zellantwort, ist für die Entwicklung neuartiger Impfstoffe essentiell, da sie Schutz gegen intrazelluläre Krankheitserreger und auch Tumore vermitteln kann.

Im Rahmen des DFG Schwerpunktes „Neue Vakzinierungsstrategien“, wurde am Max von Pettenkofer-Institut (München) gezeigt, dass die orale Immunisierung mit dem dort entwickelten Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ , der das Fusionsprotein YopE/LLO transloziert, zur Bildung einer protektiven CD8 T-Zellantwort führt.

Aufgrund der Komplexität der CD8 T-Zellantwort, ist deren exakte Charakterisierung für die Entwicklung eines *Yersinia*-basierten Impfstammes unerlässlich. In dieser experimentellen Doktorarbeit wurden folgende Analysen zur Charakterisierung der CD8 T-Zellantwort durchgeführt:

1. Erstmalige quantitative Analyse der *Yersinia*-induzierten antigenspezifischen CD8 T-Zellantwort mittels MHC-Tetramertechnologie.
2. Quantitative Analyse der CD8 T-Zellsubpopulationen.
3. Analyse des zeitlichen Verlaufs der CD8 T-Zellentwicklung.
4. Analyse der organspezifischen CD8 T-Zellentwicklung.
5. Funktionelle Charakterisierung der antigenspezifischen CD8 T-Zellen.
6. Vergleich der Impfstämme *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  und *Salmonella typhimurium* SB824.



## B MATERIAL UND METHODEN

---

## B.1 GERÄTE

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle B 1 aufgeführt.

**Tabelle B 1: Verwendete Gerätemodelle mit Hersteller**

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Firma</b>
<b>Analysenwaage</b>	Kern 440-33	Sartorius, Göttingen
<b>Brutschrank</b>	Typ B 20	Heraeus, Hanau
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubator</b>	Cytoperm 2	Heraeus, Hanau
<b>Durchflusszytometer</b>	FACSCanto™II	BD, Heidelberg
<b>Elektroblot- Apparatur</b>	Mini Trans Blot® System	Bio-Rad, München
<b>Elektrophoresekammer für SDS-Gele</b>	MiniPROTEAN 2® Cell System	Bio-Rad, München
<b>Homogenisator</b>	MM 2000	Retsch, Wuppertal
<b>Inverses Mikroskop</b>	Axiovert	Zeiss, Jena
<b>pH-Meter</b>	320 pH-Meter	Mettler, Toledo
<b>Pipetten</b>	Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
<b>Schüttelinkubator</b>	Certomat BS-1	Braun, Melsungen
<b>Spannungsquellen</b>	Power Pac 200 und 300	Bio-Rad, München
<b>Spektralfotometer</b>	Spectronic 20	Spectronic instruments, Rochester, USA
<b>Sterilwerkbank</b>	Herasafe HS 12	Heraeus, Hanau
<b>Vakuumzentrifuge</b>	Savant DNA 110 SpeedVac	Thermo Electron Corpora- tion, Langensfeld
<b>Wasserbad</b>	WB/OB7-45	Memmert, Schwabach
<b>Zentrifugen</b>	Eppendorf 5417C und 5810R	Eppendorf, Hamburg
	Sorvall super-21	Sorvall, Langensfeld

## B.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien können Tabelle B 2 entnommen werden.

**Tabelle B 2: Verwendetes Verbrauchsmaterial**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Firma</b>
<b>24 Lochplatten Zellkultur</b>	Beckton Dickinson, Heidelberg
<b>96 Lochplatten Rundboden</b>	Hartenstein, Würzburg
<b>Einmalspritzen (10 ml)</b>	Braun, Melsungen
<b>FACS Rundbodenröhrchen</b>	Beckton Dickinson, Heidelberg
<b>Gel-Blotting Papier</b>	Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel
<b>Kodak X-Omat Röntgenfilme</b>	Sigma Aldrich, Taufkirchen
<b>Nitrocellulose-Membran (Protran, BA85)</b>	Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel
<b>Nylonfilter 50 µm</b>	Hartenstein, Würzburg
<b>Petrischalen (Plastik)</b>	Greiner bio-one Frickenhausen
<b>Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml (ERG)</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml (Falcon)</b>	Beckton Dickinson, Heidelberg
<b>Sterilfilter 0,22 µm und 0,45 µm (Millex)</b>	Millipore, Schwalbach
<b>Zellsiebe 70 µm</b>	Beckton Dickinson, Heidelberg

## B.3 CHEMIKALIEN, BIOCHEMIKALIEN UND ENZYME

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme wurden von den Firmen Sigma Aldrich (Taufkirchen), Invitrogen (Karlsruhe), Carl Roth (Karlsruhe) und PAN (Aidenbach) bezogen. Abweichende Hersteller werden an entsprechender Stelle der Arbeit genannt.

## B.4 PUFFER UND LÖSUNGEN

Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle B 3 aufgeführt.

Tabelle B 3: Nach Methoden sortierte Puffer und Lösungen und ihre Zusammensetzung

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b><i>Proteinbiochemische Methoden</i></b>	
<b>1x Laemmli</b>	Glycin 2 M; Tris 250 mM, SDS 1 % (M/v)
<b>4x Tris/HCl pH 6,8</b>	Tris/HCl 0,5 M; SDS 0,4 % (M/v); pH 6,8
<b>4x Tris/HCl pH 8,8</b>	Tris/HCl 1,5 M; SDS 0,4 % (M/v); pH 8,8
<b>Coomassie- Lösung</b>	Coomassie Brilliant Blue R 250 2,5 mg; Methanol 455 ml; Eisessig 80 ml; H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ad 5 ml
<b>Entfärberlösung</b>	Methanol 40 % (V/v); Essigsäure 10 % (V/v)
<b>Sammelgel</b>	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 2,2 ml; ProtoGel <sup>®</sup> 630 µl; 4x Tris/HCL (pH 6,8) 940 µl; APS (10 %) 25 µl; TEMED 5 µl
<b>SDS-Probenpuffer 4x</b>	Tris/HCl pH 6,8 2,5 %; SDS 0,35 M; Bromphenolblau 0,1 % (4,0 mg) (M/v); Glycerin 2 % (V/v); β- Mercaptoethanol 0,4 ml
<b>Transferpuffer</b>	Glycin 190 mM; Tris 25 mM; SDS 0,1 % (M/v); Methanol 20 % (V/v); pH 8,3
<b>Trenngel</b>	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 3,1 ml; ProtoGel <sup>®</sup> 2,5 ml; 4x Tris/HCl (pH 8,8) 1,9 ml; APS (10 %) 50 µl; TEMED 5 µl
<b>Waschpuffer</b>	PBS mit 0,5 % Milchpulver (M/v)
<b><i>Mausinfektionsversuche</i></b>	
<b>ACT</b>	NH <sub>4</sub> Cl 0,15 M; Tris/HCl 0,017 M; pH 7,4
<b>FACS-Puffer</b>	DPBS; BSA 0,5 % (M/v); NaN <sub>3</sub> 0,02 % (V/v); pH 8,0
<b>PFA 4 %</b>	PFA 4 % (M/v) in PBS; pH 7,4; sterilfiltrieren
<b>Puffer 1</b>	HBSS 500 ml; EDTA 190 mg
<b>Puffer 2</b>	RPMI 1640; MgCl <sub>2</sub> 1 mM; CaCl <sub>2</sub> 1 mM; FCS 5 % (V/v); Kollagenase VIII 150 U/ml
<b>Puffer 3</b>	DPBS; 5 % FCS (V/v)
<b>T-Zellmedium</b>	RPMI 1640, FCS 10 % (V/v), Penicillin (10000 U/ml) 1 % (V/v), Streptomycin (10 mg/ml) 1 % (V/v)
<b>Trypanblau- Lösung</b>	0,05 g in 10 ml DPBS; sterilfiltrieren

<sup>x</sup> ProtoGel<sup>®</sup> (30 % (M/v) Acrylamid, 0,8 % (M/v) Bisacrylamid), Biozym (Oldenburg)

## B.5 ANTIKÖRPER

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, sowie deren Anwendung, sind in Tabelle B 4 aufgeführt. Die Konzentration der Antikörper für die Durchflusszytometrie wurde vor Gebrauch mittels Titration bestimmt.

Tabelle B 4: Verwendete Antikörper

<b>Spezifität (anti-Maus)</b>	<b>Klon</b>	<b>Format</b>	<b>Anwend ung<sup>x</sup></b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>CD4</b>	GK1.5	PerCp	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
<b>CD8<math>\alpha</math></b>	53-6.7	FITC	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
	53-6.7	PE	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
	53-6.7	APC AlexaFluor <sup>®</sup> 750	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
	53-6.7	APC	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
	<b>CD62L</b>	MEL-14	APC	FACS
	MEL-14	FITC	FACS	Natu Tec GmbH, Frankfurt am Main
	MEL-14	PeCy7	FACS	Natu Tec GmbH, Frankfurt am Main
<b>CD127</b>	A7R34	APC	FACS	Natu Tec GmbH, Frankfurt am Main
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	XMG1.2	FITC	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
<b>IgG1</b>	R3-34	FITC	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
<b>CD16/ CD32</b>	93	aufgereinigt	FACS	Natu Tec GmbH, Frankfurt am Main
<b>BrdU</b>	3D4	FITC	FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
<b>M45</b>	Primär-Ak		IB	Genovac, Freiburg
<b>IgG</b>	Sekundär-Ak (Peroxidase gekoppelt)		IB	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn

<sup>x</sup> FACS: Durchflusszytometrie; IB: Immunoblot

### B.6 PEPTIDE

In dieser Arbeit wurde mit dem Peptid LLO<sub>91-99</sub> (GYKDGNEYI) des Listeriolysin O von *Listeria monocytogenes* gearbeitet. Das Peptid ist ein immundominantes Epitop, das von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten MHC I H2-K<sup>d</sup> abhängig erkannt wird (130). Es wurde von der Firma Jerini (Berlin) synthetisiert.

### B.7 TETRAMERE

MHC Klasse I-Tetramere dienen zur Detektion antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Tetramere H2-K<sup>d</sup>#45/m $\beta$ <sub>2</sub>M/LLO<sub>91-99</sub>PE und H2-K<sup>d</sup>#45/m $\beta$ <sub>2</sub>M/p60<sub>217-225</sub>PE wurden freundlicherweise von Prof. Dr. D. H. Busch (TU München) zur Verfügung gestellt und werden – in Abhängigkeit des MHC-Allels – für die Detektion von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in BALB/c Mäusen verwendet. Die Tetramere werden in seinem Labor routinemäßig hergestellt (35).

### B.8 MAUSSTAMM

Für diese Arbeit wurden CB6F1/OlaHsd (BALB/c x C57BL/6J)F1 Mäuse von Harlan/Winkelmann (Horst, Niederlande) verwendet.

Die CB6F1/OlaHsd F1 Hybride sind die Kreuzung zweier Inzuchtstämme, weiblicher BALB/cOlaHsd und männlicher C57BL/6JOlaHsd Mäuse. Die Tiere haben identisches genetisches Material. Für Gene, die bei den parental Stämmen identisch sind, sind die Mäuse homozygot, Gene, die in den beiden Maustämmen unterschiedlich sind, liegen heterozygot vor. Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2K<sup>b/d</sup>.

Für diese Arbeit wurden ausschließlich 6-8 Wochen alte CB6F1 Mäuse verwendet. Alle Mäuse wurden im Tierstall des Max von Pettenkofer-Institut in München gehalten.

## B.9 BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide, sowie deren Eigenschaften, Anwendung und Herkunft sind in Tabelle B 5 und Tabelle B 6 aufgelistet.

Tabelle B 5: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Yersinia</i> spp		
WA-314	<i>Yersinia enterocolitica</i> Serotyp 0:8; Biogruppe 1B, klinisches Isolat; pYV08+	(78)
WA-C	Plasmidloses Derivat von WA-314	(78)
WA-C(pYVΔP)	WA-C mit pYVΔyopP	(164)
WA-C(pYVΔP, pHR430)	WA-C mit pYVΔyopP und pHR430	(164)
WA-C(pYVΔP, pHR414)	WA-C mit pYVΔyopP und pHR430	(164)
<i>Salmonella</i> spp		
SB824	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium: Mutation <i>sptP:kan</i> aus dem Stamm SB237 in den Δ <i>aroA</i> -Stamm SL326	(82)
SB824(pHR231)	SB824 mit pHR231	(144)
<i>Listeria</i> spp.		
10403s	<i>Listeria monocytogenes</i> Wildtypstamm	(26)

Tabelle B 6: Verwendete Plasmide, mit Plasmideigenschaften, Antibiotikaresistenzen und genetischer Information

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pYVΔP	pYV Plasmid, Mutation <i>yopP:Kan<sup>R</sup></i>	(164)
pHR430	Expressionsvektor mit <i>SycE</i> <i>yopE</i> <sub>1-138</sub> <i>llo</i> <sub>51-363</sub> <i>m45</i> , Chlor <sup>R</sup>	(143)
pHR231	Expressionsvektor mit <i>SycE</i> <i>yopE</i> <sub>1-138</sub> <i>llo</i> <sub>51-363</sub> <i>m45</i> , Amp <sup>R</sup>	(144)
pHR414	Expressionsvektor mit <i>SycE</i> <i>yopE</i> <sub>1-138</sub> <i>p60</i> <sub>130-477</sub> <i>m45</i> , Chlor <sup>R</sup>	(143)

## B.10 NÄHRMEDIEN, ANTIBIOTIKA, ANZUCHT UND STAMMHALTUNG

## B.10.1 NÄHRMEDIEN

Die Medien wurden nach Angaben in Tabelle B 7 hergestellt und falls nötig durch Autoklavieren (121 °C, 1 bar Überdruck für 20 min) sterilisiert.

Tabelle B 7: Nährmedien für die Bakterienkultur

Medium	Hersteller bzw. Zusammensetzung
<b>Brain Heart Infusion- Agar (BHI- Agar)</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<b>Brain Heart Infusion- Medium (BHI- Medium)</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<b><i>Yersinia</i> Selektiv Agar CIN</b>	Oxoid, Wesel
<b>Einfriermedium</b>	LB mit 20 % Glycerol
<b>Luria- Bertani- Agar (LB- Agar)</b>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<b>Luria- Bertani- Medium (LB- Medium)</b>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<b>Luria- Bertani- Medium mit 0,3 M NaCl</b>	Trypton 10 g, NaCl 17,53 g, Hefeextrakt 5 g; pH 7,4–7,6

## B.10.2 ANTIBIOTIKA

Bakterienstämme wurden mit Hilfe verschiedener Antibiotikaresistenzen selektiert (s. Tabelle B 5), dazu wurde den Medien kurz vor Verwendung die entsprechende sterilfiltrierte (0,22 µm Sterilfilter) Antibiotikallösung zugegeben. Die verwendeten Antibiotika und Endkonzentrationen können Tabelle B 8 entnommen werden. Alle Antibiotika wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Tabelle B 8: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Abkürzung	Lösungsmittel	Stammlösung mg/ml	Endkonzentration µg/ml
<b>Ampicillin</b>	Amp <sup>R</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	100	100
<b>Chloramphenicol</b>	Cm <sup>R</sup>	70 % Ethanol	20	20
<b>Kanamycin</b>	Kan <sup>R</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	50	50



### B.10.3 ANZUCHT UND STAMMHALTUNG

Die Bakterienstämme wurden – wenn nicht anders angegeben – gemäß Tabelle B 9 und ihrer entsprechenden Antibiotikaresistenzen (s. Tabelle B 5 und Tabelle B 6) angezüchtet.

Für die Stammhaltung wurden die Stämme 12-16 h im entsprechenden Medium angezüchtet und bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit sterilem DPBS gewaschen, in Einfriermedium resuspendiert, gegebenenfalls aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

**Tabelle B 9: Kultivierungsbedingungen der Bakterienstämme**

<i>Bakterienstämme</i>	<i>Kultivierungsbedingungen</i>
<i>Listeria spp</i>	Inkubation bei 37 °C in LB-Medium
<i>Salmonella spp.</i>	Inkubation bei 37 °C in 0,3 M LB-Medium
<i>Yersinia spp.</i>	Inkubation bei 27 °C in LB-Medium / BHI-Medium

### B.11 AUSDIFFERENZIERUNG VON MURINEM KNOCHENMARK ZU DENDRITISCHEN ZELLEN (DCs)

Die Gewinnung von dendritischen Zellen („*dendritic cell*“, DC) aus murinem Knochenmark erfolgte nach Lutz *et. al* (112). Die Knochenmarkszellen wurden in modifiziertem RPMI mit 10 % FCS, 10 ng GM-CSF, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol angezüchtet. 2 x 10<sup>6</sup> Knochenmarkszellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und in eine bakteriologische Petrischale überführt, in der sie bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Drei Tage nach der Knochenmarkentnahme wurden 10 ml frisches angereichertes Medium ergänzt. Die DCs wurden mittels MACS („*magnetic cell sorting*“) CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) nach Herstellerangaben angereichert. Die DCs wurden 5 Tage nach Isolation verwendet.

## B.12 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

### B.12.1 ISOLIERUNG VON PROTEINEN

#### B.12.1.1 Isolierung sekretierter Yop Proteinen

Yop-Proteine werden von *Yersinia* spp. bei 37 °C und unter Ca<sup>2+</sup> Mangel in den Kulturüberstand sekretiert (77). Zum Nachweis von Mutationen in das pYV-Plasmid wurden die sekretierten Yop-Proteine aus dem Überstand isoliert. Danach wurden sie im SDS Gel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (s. B.12.2 und B.12.3).

Für die Sekretion der Yop-Proteine wurden die jeweiligen *Yersinia* Stämme für 12-16 h in BHI-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (s. Tabelle B 6) bei 27 °C angezchtet. Die Übernachtskultur wurde 1:40 in BHI-Medium verdünnt und bei 37 °C für 2 h inkubiert. Die Stimulation der Sekretion erfolgte durch Zugabe von EGTA (5 mM), Glucose (0,2 %) und MgCl<sub>2</sub> (10 mM) bei 37 °C für weitere 3 h. Danach wurde die Kultur für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Kulturüberstand abgenommen und die Proteine mit 10 % (v/v) TCA 1 h auf Eis gefällt. Die gefällten Proteine wurden 30 min bei 14000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, das Pellet in eiskaltem Aceton resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und bei 14000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Der letzte Waschschrift erfolgte mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> Die Proteine wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 50 mM Tris (pH 8,0) resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### B.12.1.2 Präparation der sekretierten Fusionsproteine

Die auf den Expressionsvektoren codierten Fusionsproteine YopE/LL0/M45 und YopE/p60/M45 werden von den *Yersinia* spp. und *Salmonella* spp. in den Kulturüberstand sekretiert. Zum Nachweis der Sekretion wurden die aus dem Überstand isolierten Proteine und das Zelllysat im SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot anhand des M45- Tags detektiert (s. B.12.2 und B.12.4).

Für die Expression der Fusionsproteine wurden die jeweiligen Bakterienstämme für 12-16 h in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (s. Tabelle B 6) bei 37 °C

angezüchtet. Die Übernachtskultur wurde 1:50 in LB-Medium (s. Tabelle B 9) mit Antibiotikum überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,7 angezogen. Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation bei 4 °C mit 5000 rpm für 10 min vom Medium abgetrennt. Der Kulturüberstand wurde durch einen 0,45 µm Sterilfilter in ein Zentrifugenröhrchen (Plastik) überführt und die Proteine mit 10 % (v/v) TCA 2 h auf Eis gefällt. Die gefällten Proteine wurden 30 min bei 10000 g und 4 °C abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml PBS (pH 7,4) resuspendiert, mit 4 ml eiskaltem Aceton versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und bei 10000 rpm und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Das Proteinpellet wurde in 1 ml Aceton resuspendiert, in ein ERG überführt und bei 14000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Proteine wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 50 mM Tris (pH 8,0) resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Pellet des Bakterienzellysats wurde in 1 ml DPBS (pH 7,4) resuspendiert und bei 4 °C mit 14000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienzellysat in 1 x Laemmli-Puffer resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### B.12.1.3 Präparation der translozierten Fusionsproteine aus DCs

Die Analyse der durch *Yersinia* spp. translozierten Fusionsproteine wurde wie für Makrophagen beschrieben (143) durchgeführt, es wurden allerdings folgende Veränderungen vorgenommen: Die Knochenmarkszellen wurden wie in B 11 beschrieben kultiviert und mit den entsprechenden Bakterienstämmen mit einer MOI von 10 bei 37 °C infiziert. Vor der Infektion wurden Übernachtskulturen der Bakterienstämme überimpft und bei 37 °C für 4 h inkubiert. Nach einer Infektionsdauer der DCs von 5 h wurden die nicht-adhärenenten Bakterien entfernt und die Zellen mit HBSS gewaschen. Der Infektionsüberstand wurde bei 8000 g für 20 min zentrifugiert und das Pellet mit den nicht adhärenenten Bakterien in 200 µl PBS aufgenommen. Die infizierten DCs wurden für 30 min mit DMEM mit 100 µl Gentamycin/ml inkubiert, um Zell assoziierte extrazelluläre Bakterien abzutöten. Danach wurden die Zellen mit 30 µg Proteinase K/ml in HBSS für 15 min bei 37 °C inkubiert, um oberflächenassoziierte Yops zu zerstören. Danach wurde 3 ml HBSS mit 2 mM PMSF dazugegeben und die Zellen bei 600 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml HBSS mit 0,1 % Triton X-100 und 1 mM PMSF lysiert und für 10 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Sterilfilter filtriert

und die Proteine mit 10 % (v/v) TCA auf Eis gefällt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (s. B.12.2). Die Detektion erfolgte mittels M45 Antikörper (s. B.12.4).

### B.12.2 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE NACH LAEMMLI (1970)

Mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine im elektrischen Feld auf Grund ihrer Ladung in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden (106). Die Proteine werden bei 95 °C in der Gegenwart von  $\beta$ -Mercaptoethanol denaturiert. Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet dabei quantitativ an die Polypeptidketten der Proteine und führt zu einer negativen Nettoladung, die sich proportional zur Größe des Polypeptids und somit zum Molekulargewicht verhält. Im elektrischen Feld wandern die SDS-beladenen Polypeptide je nach Molekulargewicht unterschiedlich schnell zur Anode und trennen sich so auf.

Nach der SDS-Gelelektrophorese können die Proteine durch Färbung mit Coomassie-Blau (s. B.12.3) sichtbar gemacht werden oder durch einen Immunoblot (s. B.12.4) spezifisch detektiert werden. Mit Hilfe eines Proteinmarkers können die Molekulargewichte bestimmt werden.

#### B.12.2.1 Herstellung des Polyacrylamidgels

Die SDS-PAGE wurde mit dem *MiniPROTEAN 2 Cell System*<sup>®</sup> von BioRad (München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden Trenngele mit 10 % und Sammelgele mit 5 % Polyacrylamidanteil hergestellt (s. Tabelle B 3).

#### B.12.2.2 Aufbereitung der Proben und Elektrophorese

Die Proteine wurden in 4 x Probenpuffer (s. Tabelle B 3) für 10 min bei 90 °C denaturiert. Danach wurden je 25  $\mu$ l der denaturierten Proben in die Geltaschen des Polyacrylamidgels aufgetragen. Parallel wurde zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteinmarker SeeBlue<sup>®</sup>Plus2 (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 V für 45 min in Laemmli-Puffer (s. Tabelle B 3) durchgeführt.

### B.12.3 COOMASSIE- FÄRBUNG

Um die Yop-Proteine sichtbar zu machen, wurden sie nach der Elektrophorese im Polyacrylamidgel angefärbt. Dazu wurde das Gel für 2 h in Coomassie-Lösung (s. Tabelle B 3) und danach für mindestens 2 h in Entfärberlösung (s. Tabelle B 3) gegeben. Das angefärbte Gel wurde mit einem handelsüblichen Scanner digitalisiert.

### B.12.4 IMMUNOBLOT (WESTERN BLOT) NACH TOWBIN (1979)

Um die Expressionsproteine spezifisch über eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu detektieren, wurde ein Western Blot durchgeführt (162).

Als ersten Schritt wurden die Proteine nach der SDS-PAGE vom Acrylamidgel elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Blot wurde mit dem *Mini Trans Blot*<sup>®</sup> System von BioRad (München) in Transferpuffer (s. Tabelle B 3) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Proteintransfer fand für 1 h bei 90 V statt.

Nach dem Transfer wurden die Proteine durch einen M45-spezifischen Antikörper identifiziert. Dazu wurde die Membran vorher zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 5 % Milchpulver in PBS ( $M/V$ ) bei RT für 1 h inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper – gegen M45 gerichtet – im Verhältnis 1:1000 in 0,5 % Milchpulver in PBS für 12 h auf einem horizontalen Schüttler. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (s. Tabelle B 3) für je 10 min bei RT entfernt. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurden im Verhältnis 1:5000 in 0,5 % Milchpulver in PBS ( $M/V$ ) eingesetzt. Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran zweimal für 10 min mit 0,5 % ( $M/V$ ) Milchpulver in PBS gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte ausschließlich mit PBS.

Die Aktivierung der HRP erfolgte durch Inkubation in einem 1:1 Gemisch der Chemilumineszenz-Lösung *WestPico Luminol/ Enhancer* und *WestPico Stable Peroxid* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn) für 2 min. Anschließend wurde ein Röntgenfilm auf die mit Plastikfolie bedeckte Membran aufgelegt, für 5-30 min exponiert, entwickelt und fixiert.

## B.13 MAUSINFEKTION UND ORGANENTNAHME

### B.13.1 MAUSPASSAGE UND HERSTELLUNG VON ALIQUOTS

#### B.13.1.1 Mauspassage von *Yersinia* spp

Die Mauspassage der *Yersinia* spp. wurde mit  $1 \times 10^6$  KBE intraperitoneal (i.p.) in C57Bl/6 Mäusen durchgeführt. Die Bakterien wurden nach 24 h durch Spülung des Peritoneums mit 5 ml DPBS reisoliert und auf LB<sub>AB</sub>-Agar ausplattiert (s. Tabelle B 3). Gepickte Kolonien der *yop*-Deletionsmutanten wurden im SDS-Gel auf die Sekretion der Yop-Effektorproteine hin kontrolliert (s. B 11.1.1). Die Stämme wurden 12-16 h in antibiotikahaltigem LB-Medium angezogen, bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert in Einfriermedium aufgenommen und gegebenenfalls aliquotiert. Die Aliquots wurden bei  $-80$  °C gelagert.

#### B.13.1.2 Herstellung von Aliquots für die Immunisierung und Infektion

*Salmonella* spp und *Listeria* spp. wurden 12-16 h in LB<sub>AB</sub>-Medium (s. Tabelle B 5) angezogen, bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert, in Einfriermedium aufgenommen und aliquotiert. Die Aliquots wurden bei  $-80$  °C gelagert.

#### B.13.1.3 Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Verdünnungsreihe der Aliquots auf LB<sub>AB</sub>-Agar (s. Tabelle B 5) ausplattiert, die Kolonien gezählt und die Gesamtkeimzahl des Aliquots bestimmt.

### B.13.2. IMMUNISIERUNG DER MÄUSE

Die Mäuse wurden mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  (pHR430), *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  (pHR414) oder *S. typhimurium* SB824 (pHR241), den entsprechenden plasmidlosen Kontrollen oder dem Wildtypstamm von *L. monocytogenes* 10403s immunisiert.

#### B.13.2.1 Orale Immunisierung mit den Impfstämmen

Zur oralen Immunisierung mit den *Yersinia*- oder *Salmonella*- Stämmen, wurde ein Aliquot der Einfrierkultur (s. B 12.1) auf Eis aufgetaut, zweimal mit DPBS gewaschen und

mit  $1 \times 10^9$  Bakterien in 20  $\mu$ l DPBS eingestellt. Die Mäuse wurden, 4 h nachdem Wasser und Futter entfernt wurden, mit Hilfe einer Pipette mit  $1 \times 10^9$  Bakterien oral immunisiert. Zur Kontrolle wurde die Gesamtkeimzahl des Inoculums bestimmt, indem eine Verdünnungsreihe auf LB<sub>AB</sub>-Agar ausplattiert wurde.

### B.13.2.2. Immunisierung mit *Listeria monocytogenes*

In dieser Arbeit wurde mit dem hochvirulenten *Listeria* Stamm 10304s gearbeitet, der eine LD<sub>50</sub> von  $4,5 \times 10^3$  hat (26). Für eine Erstinfektion mit *L. monocytogenes* 10403s wurde ein Aliquot der Einfrierkultur (s. B.13.1.2) auf Eis aufgetaut, zweimal mit DPBS gewaschen und mit  $1 \times 10^3$  Bakterien in 100  $\mu$ l DPBS eingestellt. Den Mäusen wurde intraperitoneal (i.p.)  $1 \times 10^3$  Bakterien gespritzt. Zur Kontrolle wurde die Gesamtkeimzahl des Inoculums bestimmt, indem eine Verdünnungsreihe auf LB- Agar ausplattiert wurde.

### B.13.3 ORGANENTNAHME ZUR ISOLIERUNG VON LYMPHOZYTEN

Für die Durchführung immunologischer Untersuchungen wurden Lymphozyten aus verschiedenen Organen isoliert. Zu diesem Zweck wurden Milz, Lymphknoten und Lunge der Maus entnommen. Die Organentnahme erfolgte 1, 2, 3 oder 4 Wochen nach Immunisierung. Die Mäuse wurden mit CO<sub>2</sub> erstickt, äußerlich mit Ethanol (70 %) desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert.

#### B.13.3.1 Lymphozytenanreicherung aus Milz und Lymphknoten

Die Milz und die axillären, submandibulären, inguinalen und mesenterialen Lymphknoten wurden nach dem Öffnen der Maus entnommen und in RPMI 1640-Medium gelagert. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden Milz und Lymphknoten mit dem Stempel einer Injektionsspritze über einem Zellsieb zerkleinert und erneut in RPMI 1640-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden für 7 min bei 4 °C mit 1500 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurden die Zellen gelöst und mit 5 ml ACT (s. Tabelle B 3) für 7 min bei RT einer Erythrozytenlyse unterzogen. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension 1:1 mit RPMI 1640-Medium verdünnt und bei 1500 rpm für 7 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml RPMI 1640-Medium aufgenommen, die Zellzahl ermittelt (s. B 13.3.3) und immunologisch untersucht (s. B 15).

### B.13.3.2 Lymphozytenanreicherung aus der Lunge

Um Lymphozyten aus Lungengewebe isolieren zu können, muss dieses frei von Blut sein. Aus diesem Grund wurde nach dem Öffnen der Maus die *Vena cava* durchtrennt und das Blut entfernt. Daraufhin wurde der Brustraum geöffnet und die Lunge mit einem Heparin-Natrium/ PBS-Gemisch (75 U/ml) über den rechten Vorhof gespült. Dadurch wird restliches Blut aus der Lunge gespült. Nun wurde diese mit einer Schere herausgenommen und mit einem Skalpell zerkleinert. Das zerkleinerte Lungengewebe wurde für 30 min bei RT in Puffer1 (Tabelle B 3) unter rühren inkubiert und mit Puffer3 gewaschen. Das im Puffer1 enthaltene EDTA löst die Lymphozyten aus dem Gewebe. Im Anschluss wurde das Lungengewebe für 30 min bei 37 °C in kollagenasehaltigem Puffer2 inkubiert. Die Herstellung der Einzelzellsuspension und alle weiteren Schritte erfolgen wie bei der Präparation von Milz und Lymphknoten (s. B.13.3.1).

### B.13.3.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierfür wurde die Zellsuspension 1:20 in Trypanblaulösung verdünnt, 10 µl der Verdünnung in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die nicht angefärbten Zellen gezählt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$GZZ \cong \text{Zellzahl} \times \text{Volumen der Zellsuspension} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### B.13.4 LYMPHOZYTENANREICHERUNG AUS PERIPHEREM BLUT

Zur Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut wurde dieses der Schwanzvene der Mäuse entnommen. Dazu wurden die Mäuse unter einer Infrarotlampe erwärmt, was zur Vasodilatation und somit zur Förderung der Durchblutung führt. Durch Einstechen einer Kanüle in die Schwanzvene wurden den Mäusen je 100 µl Blut entnommen und in 10 µl Heparin-Natrium (5000 I.E./0,2 ml DPBS) (ratiopharm, Ulm) aufgenommen. Danach wurde mit 10 ml ACT für 10 min bei RT eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Das Blut wurde mit 1500 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit DPBS gewaschen (1500 rpm, 5 min, RT). Die Zellen wurden dann für weitere immunologische Untersuchungen verwendet (s. B.16)



### B.14 *LISTERIA* KOLONIEBESTIMMUNG NACH BELASTUNGSINFEKTION

Um den durch die Impfstämme vermittelten Schutz zu messen, wurde die Gesamtzellzahl an Listerien nach einer letalen Infektion mit *L. monocytogenes* 10403s ermittelt.

4 Wochen nach Immunisierung mit den Impfstämmen (s. B.13.2) wurden die Mäuse mit  $1 \times 10^5$  *L. monocytogenes* 10403s intravenös (i.v.) infiziert. Nach 3 Tagen wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> getötet, die Milzen entnommen und homogenisiert. Zur Homogenisierung der Milz wurde diese in einem 2 ml ERG mit 1 ml DPBS und einer Metallkugel gegeben. Das Gefäß wurde in die Vorrichtung der Schwingmühle (Homogenisator) eingespannt und die Milz für 5 min bei Amplitude 80 zerkleinert. Diese Homogenisierung führt zu einer Zerstörung der Zellen wodurch die Listerien freigesetzt werden. Danach wurde die Gesamtkeimzahl (GKZ) bestimmt, indem Verdünnungsreihen auf LB-Medium ausplattiert wurden. Die Platten wurden 12–16 h bei 37 °C inkubiert.

### B.15 VIRULENZVERSUCHE IM MAUSINFEKTIONSMODELL

Um die Virulenzeigenschaften der *Y. enterocolitica*- und *S. typhimurim*-Impfstämme zu untersuchen, wurden Virulenzstudien im Mausinfektionsmodell durchgeführt.

Nach oraler Immunisierung der Mäuse (s. B.13.2) wurden an den Tagen 2, 3, 4, 8 und 15 nach Immunisierung, die Keime aus Leber, Milz, Lymphknoten, Peyerschen Plaques und dem Lumen des Dünndarms reisoliert und die Gesamtkeimzahl (GKZ) bestimmt.

Dazu wurden die Mäuse an den entsprechenden Tagen durch Vergasung mit CO<sub>2</sub> getötet, die Organe unter einer Sterilbank entnommen und in 1 ml (Peyersche Plaques, Lymphknoten und Milz) oder 5 ml (Leber) DPBS homogenisiert (s. B.14). Der entnommene Dünndarm wurde mit 5 ml DPBS gespült.

Die GKZ in den Organen wurde bestimmt, indem Verdünnungsreihen der Homogenisate und des Darminhaltes ausplattiert wurden. *Yersinia*-Stämme wurden auf CIN-Agar ausplattiert und 48 h bei 27 °C inkubiert; *Salmonella* spp. wurden auf LB<sub>AB</sub>-Medium ausplattiert und 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

## B.16 IMMUNOLOGISCHE METHODEN ZUR FUNKTIONSANALYSE VON LYMPHOZYTEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

### B.16.1 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Zur Analyse der aufgereinigten Lymphozyten (s. B.13.3) wurden diese 1, 2, 3 oder 4 Wochen nach der Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  (pHR430), *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  (pHR414), *S. typhimurium* SB824 (pHR231), den plasmidlosen Kontrollen oder dem Wildtypstamm *L. monocytogenes* 10403s mit verschiedenen Oberflächenmolekülen und Zytokinen (Tabelle B 4) angefärbt.

#### B.16.1.1 Markierung von Oberflächenmolekülen

Es wurden Färbungen mit fluorochrommarkierten Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker (s. Tabelle B 4) durchgeführt. Die Färbungen wurden mit  $6 \times 10^6$  der aufbereiteten Zellen aus den jeweiligen Organen (s. B.13.3) in 96-Lochplatten auf Eis durchgeführt.

Um den Fc $\gamma$ -Rezeptor zu blockieren, wurden die Zellen zuerst mit anti-CD16/CD32 (Fc-Block) in einem Volumen von 100  $\mu$ l FACS-Puffer im Verhältnis 1:100 20 min unter einer Lampe auf Eis inkubiert. Wenn nötig wurde dem Ansatz EMA im Verhältnis 1:1000 zugegeben (s. B.16.1.2). Dann erfolgte ein Waschriff, bei dem 150  $\mu$ l FACS-Puffer auf die Zellen pipettiert wurde, 2 min bei 1500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Die Oberflächenmarkierung der Zellen mit verschiedenen Antikörpern (s. Tabelle B 4) erfolgte daraufhin in einem Volumen von 50  $\mu$ l FACS-Puffer für 20 min auf Eis im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und gegebenenfalls mit PI gefärbt (s. B.16.1.2). Bei längerer Lagerung wurden die Zellen mit 1 % PFA fixiert. Bis zur Analyse im Durchflusszytometer wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

### B.16.1.2 Lebend/ Tod-Diskriminierung

Um tote Zellen ausschließen zu können, wurden diese entweder mit Ethidiummonoazid (EMA) oder Propidiumjodid (PI) gefärbt. Die irreversible EMA-Färbung wurde durchgeführt, wenn die Zellen später mit PFA 1 % fixiert werden sollten. Dazu wurde dem anti-CD16/CD32 Mix EMA (2 mg/ml DPBS) im Verhältnis 1:1000 zugegeben und parallel gefärbt (s. B.16.1.1). Bei allen anderen Oberflächenfärbungen wurden die toten Zellen mit PI angefärbt. Hierzu wurde den Zellen nach der Oberflächenmarkierung PI (4 µg/ ml DPBS) im Verhältnis 1:1 zugegeben.

### B.16.1.3 Tetramerfärbung

Die Tetramerfärbung wurde wie die Markierung von Oberflächenmolekülen durchgeführt. Dabei wurde das Tetramer 1:50 eingesetzt und zusammen mit den Oberflächenmarkern für 1 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Alle anderen Arbeitsschritte wurden wie in Abschnitt B.16.1.1 beschrieben durchgeführt.

### B.16.1.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Die intrazelluläre Zytokinfärbung wurde mit dem *Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit* mit *GolgiPlug™* (Brefeldin A) (BD, Heidelberg) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Es wurden je Ansatz  $5 \times 10^6$  aus der Milz isolierte Lymphozyten in einer 24-Lochplatte restimuliert. Dazu wurden die Zellen mit 1 µg Peptid (s. B.7) in 1 ml RPMI-1640 für 5 h bei 37 °C inkubiert. Nach 2 h der Inkubationszeit wurde 1 µg/ml *GolgiPlug™* hinzugegeben, um den intrazellulären Transport der Zytokine nach außen zu inhibieren. Nach der Stimulation wurden die Proben in eine 96-Lochplatte überführt, indem das Volumen durch Zentrifugation in 15 ml Falcons (5 min, 4 °C, 1500 rpm) reduziert wurde. Dann wurden die Zellen mit Fc-Block und EMA, anschließend mit Oberflächenmarkern gefärbt (s. B.16.1.1).

Danach wurden die Zellen mit 100 µl *Cytofix/Cytoperm™* für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert, um die Zellwände zu permeabilisieren. Nach einem Waschschrift bei dem 150 µl *PermWash*-Puffer auf die Zellen pipettiert, 2 min bei 1500 g zentrifugiert und der

Überstand verworfen wurde, folgte die Intrazellulärezytokinfärbung für 30 min auf Eis im Dunkeln in einem Volumen von 50 µl *PermWash*-Puffer. Parallel wurde eine Färbung mit einer Isotyp-entsprechenden Kontrolle mit irrelevanter Spezifität durchgeführt. Nach zwei Waschschritten mit *PermWash*-Puffer und FACS-Puffer wurden die Zellen in 1 % PFA fixiert und bis zur Auswertung am Durchflusszytometer bei 4 °C gelagert.

### B.16.2 BROMDESOXYURIDIN (BRDU)- FÄRBUNG

Bromdesoxyuridin (BrdU) lagert sich als Analogon zu Thymidin in die DNA proliferierender Zellen ein, und wird *in vivo* zur Messung der Proliferationsfähigkeit von Zellen verwendet. Diese wurde in vorliegender Arbeit bei immunisierten Mäusen nach einer Belastungsinfektion mit Listerien (s. B.14) gemessen. Es wurde das *FITC BrdU Flow Kit* (BD, Heidelberg) verwendet und nach Herstellerangaben gearbeitet.

Die Mäuse wurden 4 Wochen nach Immunisierung mit  $1 \times 10^5$  *L. monocytogenes* 10403s intravenös (i.v.) infiziert und gleichzeitig 1-2 mg BrdU (10 mg/ml DPBS) intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Zusätzlich wurde den Mäusen BrdU über das Trinkwasser (1 mg/ml) verabreicht. An Tag 3 wurden die Mäuse getötet, die Milzen wie beschrieben präpariert, eine Einzelzellsuspension hergestellt (s. B.13.3.1) und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wie folgt gefärbt.

Es wurden pro Milz  $1 \times 10^6$  Zellen in einer 96-Lochplatte mit Fc-Block und EMA, anschließend mit Oberflächenmarkern, sowie Tetramer gefärbt (s. B.16.1.3). Danach wurden die Zellen zuerst mit 100 µl *Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup>* und dann mit 50 µl *Cytoperm<sup>TM</sup> Plus Buffer* jeweils für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut für 5 min auf Eis im Dunkeln mit *Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup>* behandelt und mit *PermWash*-Puffer gewaschen. Dadurch wird die Zellwand der Zellen zerstört und der Verdau der DNA ermöglicht. Dieser erfolgte mit 300 µg/ml DNase für 1 h bei 37 °C im Dunkeln. Nach einem Waschschrift in *PermWash*-Puffer, wurde das in die DNA eingelagerte BrdU mit einem spezifischen Antikörper für 30 min bei 4 °C im Dunkeln gefärbt. Nach zwei Waschschritten mit *PermWash* und FACS-Puffer wurden die Zellen in 1 % PFA fixiert und bis zur Analyse am Durchflusszytometer bei 4 °C gelagert.

### B.16.3 *IN VIVO ZYTOTOXIZITÄTSTEST*

Der *in vivo* Zytotoxizitätstest erlaubt die Messung der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen direkt in immunisierten Mäusen.

Naive CB6F1 Mäuse dienen dabei als Donormäuse. Von diesen wurden die Milzen wie beschrieben präpariert und eine Einzelzellsuspension hergestellt (s. B.13.3.1). Die Zellen wurden gezählt, in T-Zellmedium aufgenommen und in zwei Populationen aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit Peptid beladen, indem die Zellen mit 1 mg/ml LLO-Peptid in RPMI- 1460 für 45 min bei 37 °C inkubiert wurde; Die andere Hälfte der Zellen blieb unbeladen. Im Anschluß wurden beide Populationen zweimal mit DPBS gewaschen.

Danach wurden die Populationen mit unterschiedlichen Konzentrationen an CFSE gefärbt, um sie im Durchflusszytometer unterscheiden zu können. Die mit LLO beladene Population wurde mit einer hohen Konzentration CFSE (5 µM) angefärbt (CFSE<sub>hoch</sub>); Die unbeladenen Zellen wurden mit einer niedrigen Konzentration CFSE (0,5 µM) angefärbt (CFSE<sub>niedrig</sub>). Die CFSE-Färbung wurde bei 37 °C für 10 min durchgeführt, T-Zellmedium dazugegeben, für 5 min auf Eis inkubiert und danach mit DPBS gewaschen.

Dann wurden die Zellen beider Populationen im Verhältnis 1:1 vermischt, so dass jede Maus etwa 6 x 10<sup>6</sup> Zellen/ 200 µl i.v. gespritzt bekam. Die Zellen wurden in CB6F1-Mäuse injiziert, die 4 Wochen zuvor immunisiert worden waren. Nach 5 h wurden die Mäuse geblutet; Nach 20 h wurden die Mäuse getötet und ihre Milz entnommen. Das Blut und die präparierten Milzzellen wurden wie beschrieben präpariert (s. B.13.3.1 und B.13.4) und direkt mittels Durchflusszytometrie analysiert. Jede der beiden Zellpopulationen kann durch ihre unterschiedliche CFSE-Fluoreszenzintensität detektiert werden.

Die zytotoxische Effektorfunktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde mit folgenden Formeln über die spezifische Lyse berechnet:

*Verhältnis beider Populationen zueinander (r):*

$$r = \frac{\% CFSE_{niedrig}}{\% CFSE_{hoch}}$$

*Prozentsatz der spezifischen Lyse (sL):*

$$sL = \left[ 1 - \left( \frac{r \text{ von nicht immunisierter Maus}}{r \text{ von immunisierter Maus}} \right) \times 100 \right]$$

## B.17 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS-ANALYSE)

In einem Durchflusszytometer (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) kann die Größe, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität von Zellen gemessen und unterschieden werden.

Dazu werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei beim Passieren jeder einzelnen Zelle das Licht gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC) ist das Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) das Maß für die Granularität einer Zelle.

Um Zellen außer in ihrer Größe und Granularität unterscheiden zu können, wurden sie mit verschiedenen Fluorochromen angefärbt. Fluorochrome absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch sogenannte *Photomultiplier* des FACS in elektrische Signale umgewandelt. Dadurch erhält man Informationen über die Anzahl der fluoreszierenden Zellen, sowie deren Fluoreszenzintensität.

Die Analyse der gemessenen Zellen erfolgt in einem entsprechenden Computerprogramm über die Größe, Granularität und Fluoreszenzfarbstoffe. Dabei werden Zellpopulationen die aufgrund der vorher genannten Eigenschaften von Interesse sind mit sogenannten „*Gates*“ eingegrenzt und im Detail betrachtet.

Die Durchflusszytometrie wurde mit dem *BD FACSCanto™ II Flow Cytometry System* mit der *BD FACSDiva™ Software* (BD, Heidelberg) durchgeführt. Zur Datenanalyse wurde die *FLOWJO Flow Cytometry Analysis Software* (Tree Star, Ashland), sowie die *GraphPad Prism Software* (GraphPad Software, La Jolla) verwendet.

## C ERGEBNISSE

---

In unserem Labor wurde gezeigt, dass durch orale Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten *Yersinia* spp.-Stämmen, die immunodominante LLO- bzw. p60-Epitope exprimieren, eine antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort entsteht. Die gebildeten LLO- bzw. p60-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermitteln Schutz gegenüber einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* (89;143;144;146;163). Für die Entwicklung eines wirksamen Impfstammes ist es erforderlich, die schutzvermittelnde CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort detailliert zu charakterisieren.

### C.1 DER *Y. ENTEROCOLITICA* pYV $\Delta$ YOPP IMPFSTAMM

Die *Yersinia enterocolitica*  $\Delta$ yopP Mutante wurde von Trülzsch *et. al* als Impfstamm beschrieben (163;164). Zur Konstruktion von *Y. enterocolitica*  $\Delta$ yopP wurde das auf dem pYV Plasmid lokalisierte yopP mittels ET-Klonierung durch eine *kan<sup>r</sup>* Kasette ersetzt und in den plasmidlosen *Y. enterocolitica* WA-C Stamm transferiert (164). Das 70 kb große pYV-Plasmid kodiert für das Typ III Sekretionssystem (T3SS) und dessen translozierte Effektorproteine („*Yersinia outer proteins*“, Yops). Das Ausschalten des YopP-Proteins resultiert in einer verminderten Virulenz. Im C57/Bl6-Mausmodell kolonisiert die  $\Delta$ yopP-Mutante den Darm, die Peyerschen Plaques und verzögert Milz und Leber. Die Tiere erholen sich im Gegensatz zur Wildtyp-Infektion von einer Infektion mit *Y. enterocolitica*  $\Delta$ yopP vollständig (164).

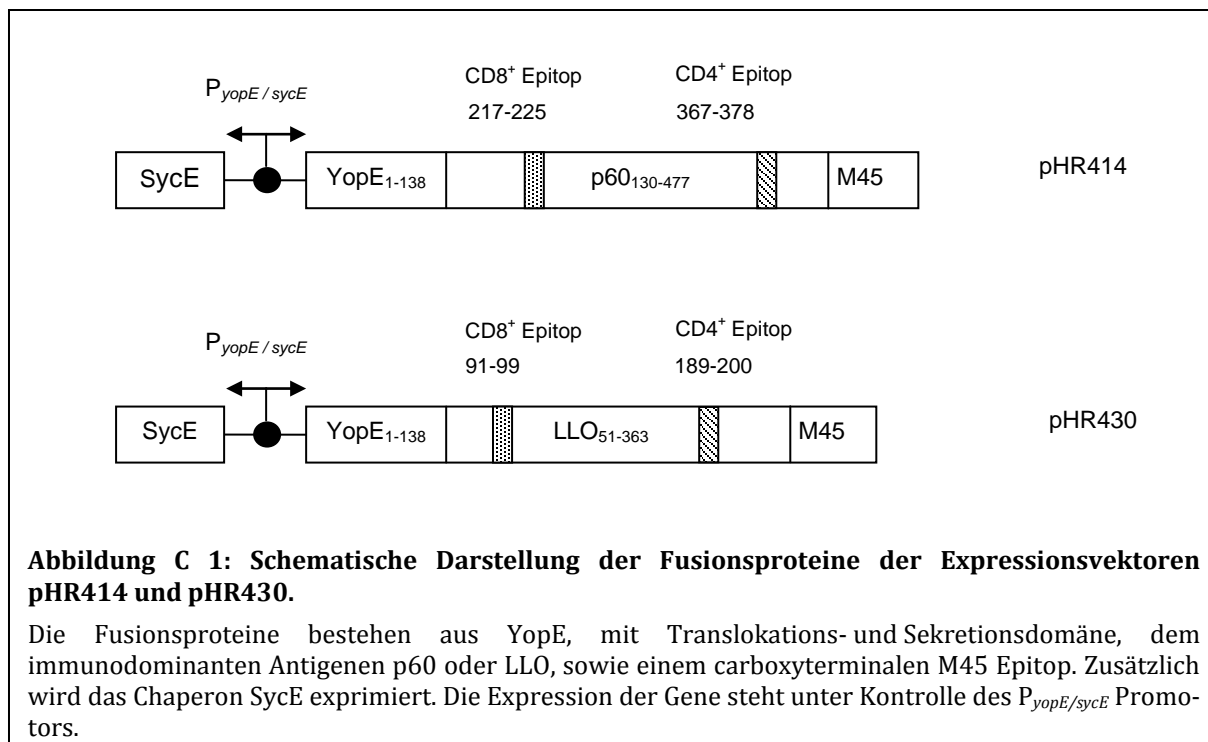
Als Fusionsproteine, die über das T3SS in die Wirtszelle transloziert werden, wurden YopE<sub>1-138</sub>/LLO<sub>51-363</sub>/M45 und YopE<sub>1-138</sub>/p60<sub>130-477</sub>/M45 gewählt, die auf dem von Rüssmann *et. al* beschriebenen Expressionsvektoren pHR430 und pHR414 kodiert sind (Abbildung C 1) (143). Die AS 51-363 des Listeriolysin O (LLO) bzw. AS 130-477 des p60-Proteins von *L. monocytogenes* sind an das YopE Fragment (AS 1–138), das die genetische Information der Sekretions- und Translokationsdomäne von YopE enthält, fusioniert. Sowohl das LLO- als auch das p60-Fragment enthalten ein immunodominantes H-2Kd abhängiges CD8<sup>+</sup> T-Zellepitop an Position 91-99 (LLO<sub>91-99</sub>) und 217-225 (p60<sub>217-225</sub>). Zusätzlich liegt jeweils ein CD4<sup>+</sup> immunodominantes Epitop vor (Abbildung C 1). Neben diesen antigenen Strukturen enthält das Plasmid die genetische Information für das Chaperon SycE. Die gleichzeitige Expression von *sycE* mit *yopE* führt zu einer erhöhten Effizienz der Translokation und Antigenpräsentation der Listerienproteine



## C Ergebnisse

(146). Am C-Terminus hängt ein M45-Epitop, welches sich vom adenoviralen E4-6/7-Protein ableitet und die Detektion des Fusionsproteins mittels Immunoblot ermöglicht (126).

Der attenuierte *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  Stamm wurde mit den Expressionsvektoren pHR430 und pHR414 transformiert. Die Konstrukte *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  (YopE/LLO/M45) und *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  (YopE/p60/M45) lagen zu Beginn meiner Arbeit vor, und wurden von mir für die folgenden Immunisierungsstudien eingesetzt. Der Stamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  ohne Expressionsvektor wurde als negative Kontrolle eingesetzt. In der weiteren Arbeit werden die Stämme als  $\Delta yopP$ (LLO),  $\Delta yopP$ (p60) und  $\Delta yopP$  bezeichnet.



## C.2 ÜBERPRÜFUNG DER YOPP DELETIONSMUTANTE MITTELS SDS-PAGE

Die Deletion des auf dem pYV-Plasmids lokalisierten *yopP*-Gens der *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  Mutante wurde überprüft, indem die sekretierten Yop-Proteine aus dem Kulturüberstand isoliert, mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt wurden. Yop-Proteine werden von *Yersinia* spp. bei 37 °C und unter Ca<sup>2+</sup> Mangel in den Kulturüberstand sekretiert. Im SDS-Gel aufgetrennt entsteht ein typisches Bandenmuster (77).

In Abbildung C 2 ist das typische Bandenmuster der sekretierten Yop-Proteine zu erkennen. Untersucht wurde *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  und zum Vergleich der Wildtyp WA-314. Die schwarzen Pfeile markieren die Stelle an der das YopP-Protein sichtbar sein müsste und zeigen deutlich, dass YopP nicht sekretiert wird.

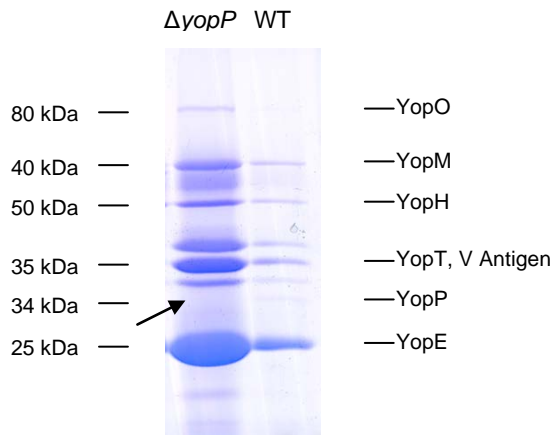
## C.3 T3SS-ABHÄNGIGE SEKRETION DER LLO-HYBRIDPROTEINE *IN VITRO*

Die Sekretion der Hybridproteine YopE/LLO/M45 und YopE/p60/M45 von *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) und  $\Delta yopP$ (p60) wurde mittels des C-terminalen M45-Peptids durch einen Immunoblot überprüft (s. B 11.4). Dazu wurden die Zelllysate und die aus dem Kulturüberstand aufgereinigten Proteine von  $\Delta yopP$ (LLO) und  $\Delta yopP$ (p60) untersucht. Wie in Abbildung C 3 zu sehen ist, wurde sowohl im Zelllysat als auch aus dem Überstand das 43 kDa große YopE/LLO/M45 und das 58 kDa große YopE/p60/M45 Protein durch anti-M45-Antikörper detektiert. Somit ist erwiesen, dass die Fusionsproteine in den Überstand sekretiert werden.

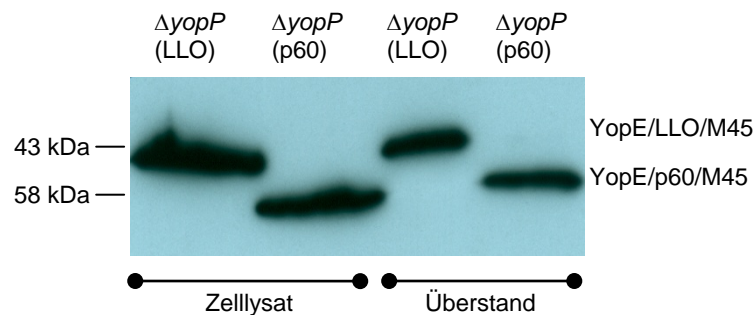
## C.4 T3SS ABHÄNGIGE TRANSLOKATION DES LLO HYBRIDPROTEINS

Um die Translokation des Hybridproteins YopE/LLO/M45 in dendritische Zellen („*dendritic cells*“, DC) durch *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) und durch WA-314 (LLO) zu zeigen, wurden intrazelluläre Fraktionen einer Immunoblot-Analyse unterzogen (s. B.12.4). Wie in Abbildung C 4 zu sehen ist, wurde YopE/LLO/M45 in das Zytosol von DCs transloziert. Weiterhin ist zu beobachten, dass von WA-314 und *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  gleiche Mengen an Protein transloziert wurden. Es konnte somit deutlich gezeigt werden, dass eine Translokation von LLO-Hybridproteinen durch eine YopE-abhängige Expression erreicht werden kann.

## C Ergebnisse

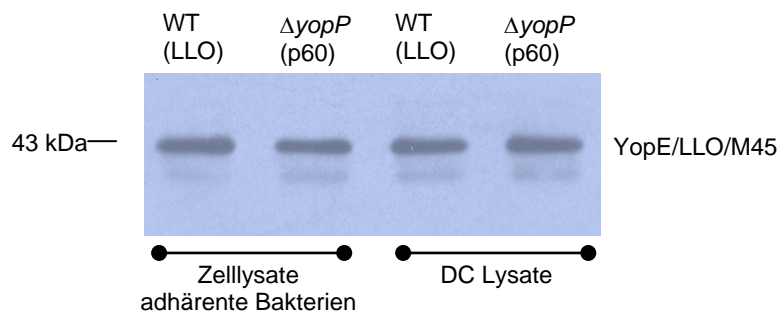


**Abbildung C 2: Durch *Y. enterocolitica* WA-314 und *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  sekretierte Proteine.**  
Das Coomassie Blau gefärbte SDS-Gel zeigt die sekretierten Yops des WT Stammes WA-314, sowie der Mutante  $\Delta yopP$ . Der schwarze Pfeil zeigt die Stelle an der YopP zu sehen sein müsste.



**Abbildung C 3: T3SS-abhängige Sekretion der Hybridproteine YopE/LLO/M45 und YopE/p60/M45**

Mittels SDS-PAGE und Western Blot wurde die Sekretion der Fusionsproteine durch die rekombinanten *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  Stämme mit den Vektoren pHR430 bzw. pHR414 in den Kulturüberstand gezeigt. Die YopE Fusionsproteine wurde mit einem M45-Antikörper detektiert



**Abbildung C 4: Translokation von YopE/LLO/M45 in das Zytosol von DCs durch *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) und Wildtyp-Stamm WA-314 (LLO)**

Mittels Immunoblot wurde die Translokation der Fusionsproteine in DCs gezeigt. Die Abbildung zeigt die Zelllysate der nicht-adhärenenten Bakterien und die Triton X-100 löslichen DC-Lysate. Die Hybridproteine wurden mittels Immunoblot mit einem M45-Antikörper detektiert.

## C.5 NACHWEIS LLO- UND p60-SPEZIFISCHER CD8<sup>+</sup> T-ZELLEN MITTELS TETRAMER-TECHNOLOGIE

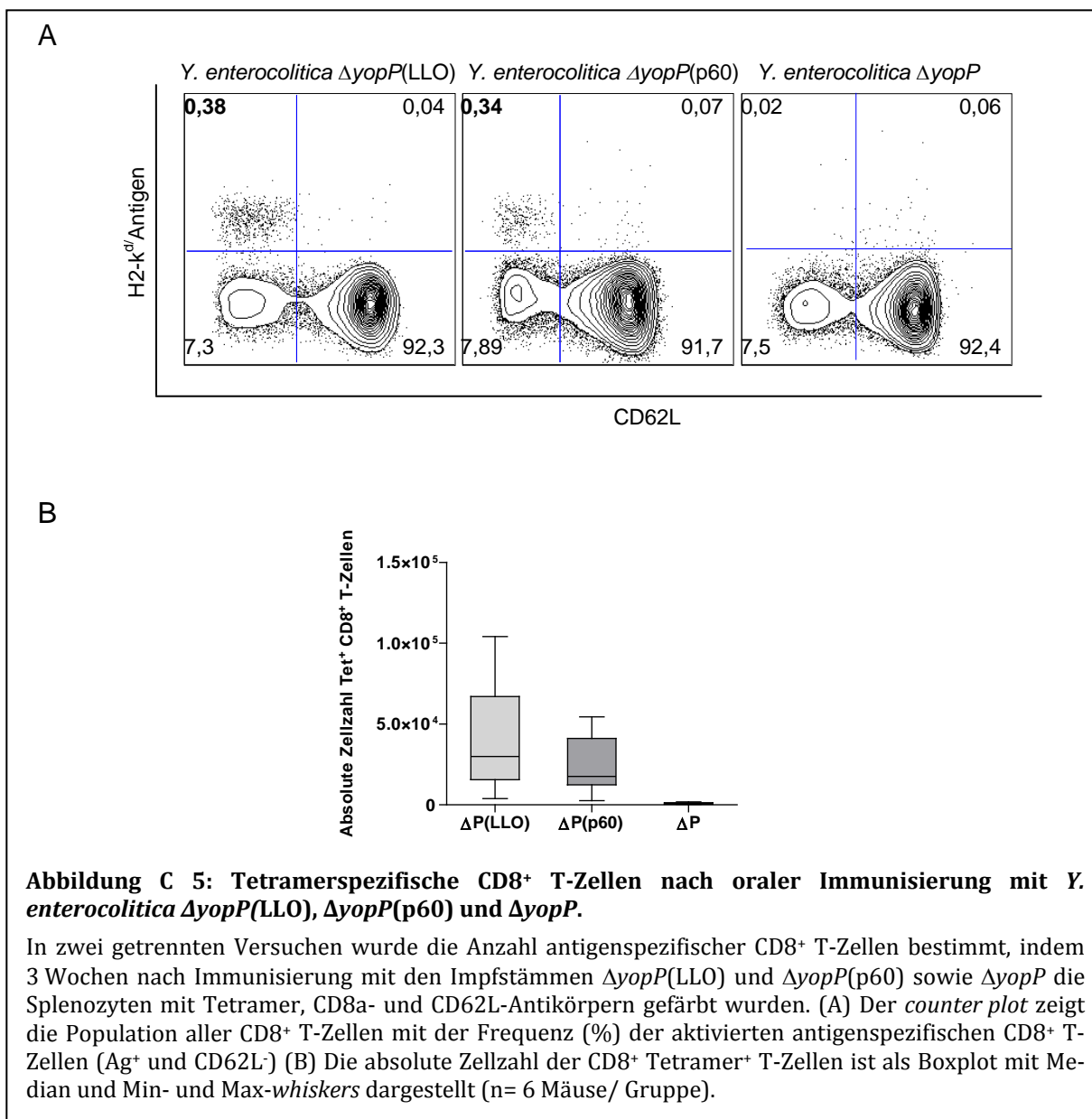
Zu Beginn der Arbeit wurde die Anzahl p60- bzw. LLO-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung mit dem Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ , der entweder LLO oder p60 als Antigen exprimiert, bestimmt, um die Immunogenität der beiden Antigene im CB6F1-Mausmodell zu testen. Dazu wurden Gruppen von sechs CB6F1-Mäusen mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP(p60)$  oder *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP(LLO)$  oral immunisiert und 3 Wochen nach Immunisierung mittels Tetramertechnologie und FACS-Analyse die tetramerspezifischen CD8 T-Zellen bestimmt. Als Kontrolle wurde die Anzahl LLO-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen von *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  ohne Expressionsvektor bestimmt.

Die Tetramertechnologie ist eine Methode der Immunologie, die die direkte Analyse antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen *ex vivo* ermöglicht (9). Ein Tetramer besteht aus vier Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexen, die an fluorchrommarkiertes Streptavidin gebunden sind. Das erlaubt die gleichzeitige Bindung an bis zu vier peptidspezifische T-Zellrezeptoren (TCR), und verringert somit die Dissoziationsrate des Tetramers. Peptid-MHC-Klasse-I-Tetramere binden zytotoxische T-Zellen (CTLs) mit einer Sensitivität von bis zu 1 in 5000 CD8<sup>+</sup> T-Zellen (46). Dies erlaubt die Analyse von CTLs, die nur in geringen Frequenzen vorkommen. Für die Detektion LLO- bzw. p60-spezifischer CTLs wurden H2-K<sup>d</sup>#45/m $\beta$ <sub>2</sub>M/LLO<sub>91-99</sub>PE bzw. H2-K<sup>d</sup>#45/m $\beta$ <sub>2</sub>M/p60<sub>217-225</sub>PE-Tetramere, im folgenden Text nur noch LLO<sub>91-99</sub>- bzw. p60<sub>217-225</sub>-Tetramer genannt, verwendet. Mit Hilfe der antigenspezifischen Tetramerfärbung und weiteren Oberflächenmarkern ist eine sehr spezifische Analyse von CD8<sup>+</sup> T-Zellen möglich.

Es wurden Splenozyten der drei Immunisierungsgruppen  $\Delta yopP(LLO)$ ,  $\Delta yopP(p60)$  und  $\Delta yopP$  mit LLO<sub>91-99</sub>- bzw. p60<sub>217-225</sub>-Tetramer, sowie CD8- und CD62L-Antikörpern analysiert. Über den Oberflächenmarker CD62L (L-Selektin) wird der Aktivierungsstatus der CD8<sup>+</sup> Tetramer<sup>+</sup> T-Zellen überprüft. L-Selektin vermittelt in der Maus die Wanderung von T-Zellen in lymphatisches Gewebe. Die Expression von L-Selektin, ist bei aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen herunterreguliert (108). Wie in Abbildung C 5 A exemplarisch dargestellt ist, konnten in den Milzzellen beider Immunisierungsgruppen aktivierte LLO<sub>91-99</sub>- bzw. p60<sub>217-225</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Für beide

## C Ergebnisse

Gruppen wurde der Mittelwert der CTL Frequenzen ermittelt: Die mit  $\Delta yopP(LLO)$  oder  $\Delta yopP(p60)$  immunisierten Gruppen zeigen mit 0,38 % und 0,34 % vergleichbare Frequenzen an antigenspezifischen CTLs. Betrachtet man die absoluten Zellzahlen der beiden Gruppen liegt die Anzahl der gebildeten Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei einer Immunisierung mit  $\Delta yopP(LLO)$  bei  $3,0 \times 10^4$  und bei  $\Delta yopP(p60)$  bei  $1,7 \times 10^4$  pro Milz (s. Abbildung C 5 B). Vergleicht man die absolute Zellzahl als auch die Frequenz beider Impfstämme mittels T-Test kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $P \geq 0,05$ ). Für die weiteren Immunisierungsstudien zur Charakterisierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort wurde der *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP(LLO)$  Impfstamm gewählt.



## C.6 SCHUTZVERSUCH

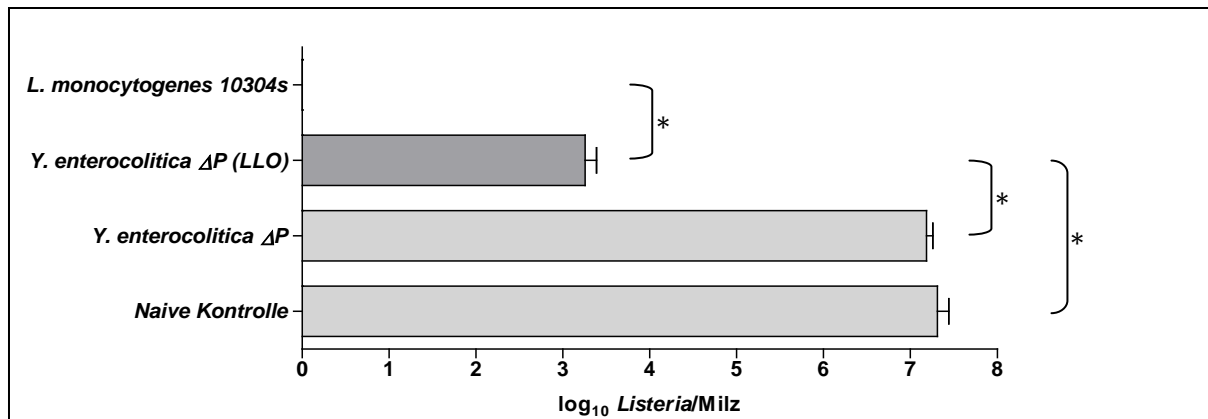
Durch die Tetramerfärbung konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit  $\Delta yopP(LLO)$  zur Bildung von LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt. Es wurde nun untersucht, ob diese Immunantwort ausreicht, um Schutz vor einer Infektion mit Wildtyp *L. monocytogenes* im CB6F1-Mausmodell zu gewährleisten.

*L. monocytogenes* ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium, das das porenbildende Zytotoxin Listeriolysin O (LLO) freisetzt, um so ins Zytosol infizierter Wirtszellen zu gelangen. LLO besitzt ein H2K<sup>d</sup>-restringiertes immundominantes CD8-Epitop an der Aminosäurestelle 91-99 (129;130). Das heißt, die durch die Immunisierung generierten LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnten in der Lage sein, Schutz gegenüber einer *L. monocytogenes*-Infektion zu verleihen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden mit  $\Delta yopP(LLO)$  und - als Kontrolle - mit  $\Delta yopP$  und Listerien immunisierte Mäuse, sowie eine Gruppe naiver Mäuse, vier Wochen nach der Immunisierung mit einer letalen Dosis von  $1 \times 10^5$  *L. monocytogenes* 10403s intravenös (i.v.) infiziert.

Drei Tage nach der Belastungsinfektion wurden die Milzen homogenisiert und die Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) der überlebenden Listerien bestimmt (s. Abbildung C 6). Die Kontrollgruppe, die mit einer subletalen *L. monocytogenes*-Dosis immunisiert worden war (immune Kontrollgruppe), zeigte erwartungsgemäß Schutz gegenüber der Listerien-Belastungsinfektion. Wie in Abbildung C 6 zu sehen ist, konnten keine Listerien in den Milzen nachgewiesen werden (0 Bakterien/Milz). Die naiven Mäuse hingegen waren vollkommen ungeschützt gegenüber der Listerien-Infektion. Es konnten  $2,0 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^7$  KBE in den Milzen detektiert werden. Aus den Mäusen, die mit dem  $\Delta yopP$  Impfstamm, der kein heterologes Antigen exprimiert, immunisiert wurden, konnten  $1,5 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$  *Listeria*/Milz reisoliert werden. Damit liegt kein signifikanter Unterschied zur naiven Gruppe vor ( $P > 0,05$ ).

In mit  $\Delta yopP(LLO)$  immunisierten Mäusen konnte dagegen partieller Schutz gegenüber einer Listerieninfektion nachgewiesen werden. Es wurden mit  $1,8 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^3$  Listerien/Milz um  $4 \log_{10}$  weniger KBE reisoliert als in den naiven Mäusen.

## C Ergebnisse



**Abbildung C 6: In mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) immunisierten Mäusen generierter Schutz nach Infektion mit letaler Dosis von *L. monocytogenes* 10304s**

Gruppen von je 5 Mäusen wurde mit dem Impfstamm  $\Delta yopP$ (LLO), mit *L. monocytogenes* als Positivkontrolle und als Negativkontrolle mit  $\Delta yopP$ , der kein YopE/LLO/M45 transloziert, immunisiert. 4 Wochen nach Immunisierung wurden diese Mäuse und zusätzlich naive Mäuse mit  $10^5$  KBE von *L. monocytogenes* infiziert und die KBE nach 72 h in der Milz bestimmt. Die Ergebnisse sind als  $\log_{10}$  Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Sterne zeigen signifikante Unterschiede ( $P \leq 0,05$ ).

### C.7 CHARAKTERISIERUNG DER CD8 T-ZELLANTWORT

Durch eine Immunisierung mit dem Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO), der das Fusionsprotein YopE/LLO/M45 in das Zytosol seiner Wirtszellen injiziert, werden LLO<sup>+</sup>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen generiert, die Schutz gegenüber einer Listerieninfektion vermitteln.

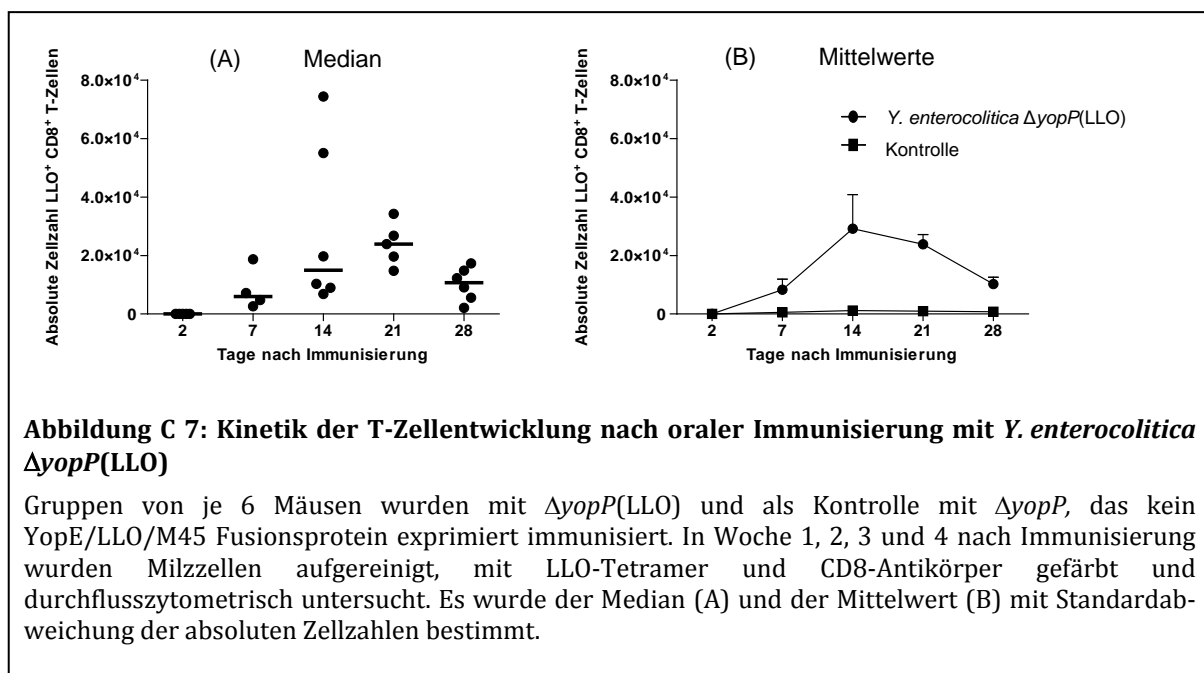
Die Komplexität der T-Zellantwort macht eine genaue Charakterisierung der spezifischen T-Zellen erforderlich. Dabei wurden neben der Quantität auch die Kinetik der T-Zellantwort sowie die Verteilung der CD8 T-Zellsubpopulationen bestimmt. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit neben der phänotypischen Charakterisierung auch eine funktionelle Charakterisierung durchgeführt.

C.7.1 KINETIK DER CD8<sup>+</sup> T-ZELLEXPANSION

Um die Expansion der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort nach der Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP(LLO)$  zu untersuchen, wurden Gruppen von sechs CB6F1-Mäusen oral immunisiert und Tetramerfärbungen mit den Splenozyten in Woche 1, 2, 3 und 4 nach Immunisierung durchgeführt und statistisch ausgewertet („Graph Pad Prism“). Als Negativkontrolle diente eine mit dem Stamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  immunisierte Gruppe.

Die Kinetik der Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellexpansion ist als absolute Zellzahl aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Median in Abbildung C 7 A dargestellt. Eine Woche nach Immunisierung konnten die ersten LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz detektiert werden ( $6,0 \times 10^3$ ). Diese T-Zellantwort erreicht in der dritten Woche ihr Maximum ( $2,4 \times 10^4$ ) (siehe Abbildung C 7 A). Betrachtet man neben den Median-Werten die Mittelwerte mit Standardabweichung (siehe Abbildung C 7 B) wird das Maximum, bedingt durch die in Abbildung C 7 A dargestellten Ausreißer-Werte, bereits nach zwei Wochen erreicht. In der Kontrollgruppe konnten keine LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden (s. Abbildung C 7 B).

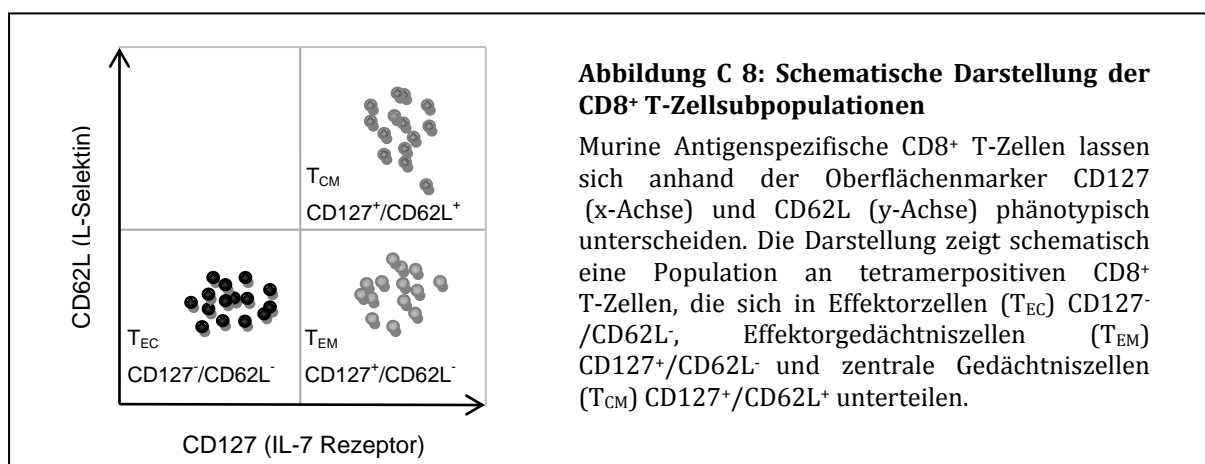
Vergleicht man dieses Ergebnis mit anderen in der Arbeit durchgeführten Versuchen zur Kinetik, sieht man, dass das Maximum der LLO<sub>91-99</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen bis zur dritten Woche nach Immunisierung erreicht wird (vgl. Kapitel C.7.3 und C.8.3).





## C.7.2 BILDUNG EINES IMMUNOLOGISCHEN GEDÄCHTNISSES

Die Grundvoraussetzung für die Wirksamkeit eines Impfstoffes ist die Bildung eines immunologischen antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellgedächtnisses. Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden in drei Subpopulationen unterteilt: Effektorzellen („*Effector T cells*“, T<sub>EC</sub>), Effektorgedächtniszellen („*Effector memory T cells*“, T<sub>EM</sub>) und zentrale Gedächtniszellen („*Central memory T cells*“, T<sub>CM</sub>). Die Unterscheidung der drei Subpopulationen ist im murinen Modell anhand von zwei Oberflächenmarkern, CD62L und CD127, möglich; L-Selektin (CD62L) wird bei aktivierten T-Zellen, d.h. T<sub>EC</sub> und T<sub>EM</sub> herunterreguliert, der IL-7 $\alpha$  Rezeptor (CD127) wird bei den Gedächtniszellen, d.h. T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub>, exprimiert. Wie in Abbildung C 8 graphisch dargestellt, ergeben sich daraus folgende Phänotypen: T<sub>EC</sub> haben den Phänotypen CD127<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup>, T<sub>EM</sub> sind CD127<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup> und T<sub>CM</sub> sind CD127<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup> (86).



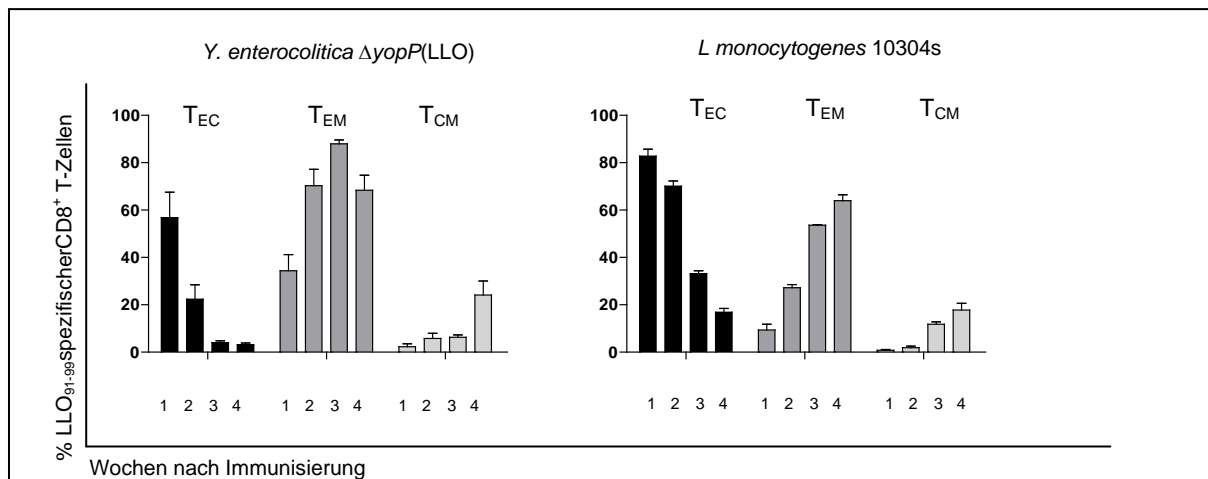
Um die Bildung von langlebigen Gedächtniszellen durch orale Immunisierung mit  $\Delta yopP(\text{LLO})$  zu untersuchen, wurde in Woche 1, 2, 3 und 4 nach Immunisierung Tetramerfärbungen mit gleichzeitiger Färbung der Oberflächenmarker CD8, CD127 und CD62L von Milzzellen durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert.

Es wurden Gruppen von CB6F1-Mäusen untersucht, die mit dem Impfstamm  $\Delta yopP(\text{LLO})$  immunisiert wurden, sowie CB6F1-Mäuse, die mit *L. monocytogenes* 10304s immunisiert wurden. Als Negativkontrolle wurden mit  $\Delta yopP$  immunisierte Mäuse untersucht (Daten nicht gezeigt).

## C Ergebnisse

In Abbildung C 9 ist der zeitliche Ablauf des Auftretens der LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen dargestellt. Die relative Verteilung zeigt folgende Tendenzen: Die T<sub>EC</sub>-Subpopulation ist in Woche 1 nach Immunisierung in beiden Immunisierungsgruppen (*L. monocytogenes* und *Y. enterocolitica* Δ*yopP*(LLO)) die Größte (82 % und 56 %) und sinkt bis Woche 4 auf Werte von 16 % und 4 % ab. Bei der mit Listerien immunisierter Gruppe sinkt die T<sub>EC</sub>-Subpopulation in dem Maße, in dem die T<sub>EM</sub>-Population ansteigt. In der ersten Woche nach Immunisierung mit *L. monocytogenes* wurden 9 % T<sub>EM</sub>-Zellen detektiert, die bis Woche 4 auf 64 % steigt. Dagegen wurde bei einer Immunisierung mit *Y. enterocolitica* Δ*yopP*(LLO) in der ersten Woche schon eine T<sub>EM</sub>-Frequenz von 34 % erreicht und bleibt dann auf einem Niveau von durchschnittlich 74 %. Die T<sub>CM</sub>-Gedächtniszellen steigen bei Immunisierung von *L. monocytogenes* bzw. *Y. enterocolitica* Δ*yopP*(LLO) bis zu einem Wert von 17 % bzw. 24 %.

In beiden Immunisierungsgruppen werden alle Subpopulationen LLO<sub>91-99</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>EC</sub>, T<sub>EM</sub>, T<sub>CM</sub>) generiert. Durch die Immunisierung mit Δ*yopP*(LLO) werden jedoch deutlich mehr T<sub>EM</sub> und weniger T<sub>EC</sub> als bei Immunisierung mit Listerien gebildet.



**Abbildung C 9: Bildung eines immunologischen Gedächtnisses durch orale Immunisierung mit dem Impfstamm *Y. enterocolitica* Δ*yopP*(LLO)**

Gruppen von 5-8 CB6F1-Mäusen wurden oral mit *Y. enterocolitica* Δ*yopP*(LLO) oder mit einer subletalen Dosis *L. monocytogenes* 10304s i.v. immunisiert. In Woche 1, 2, 3 und 4 nach Immunisierung, wurden die Milzen entfernt, und die Lymphozyten mit LLO<sub>91-99</sub>-Tetramer und CD8-, CD127- und CD62L-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die absolute Zellzahl (%) der LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen T<sub>EC</sub> (schwarz), T<sub>EM</sub> (dunkelgrau) und T<sub>CM</sub> (hellgrau) sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

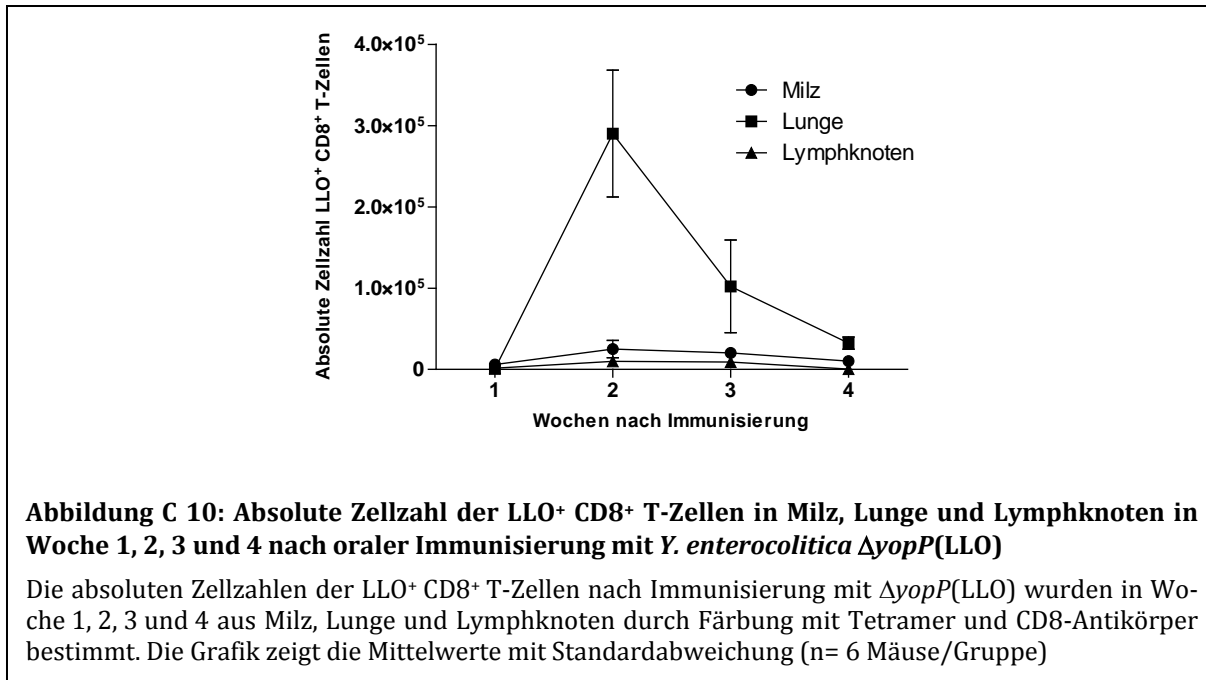
### C.7.3 LOKALISATION DER CD8-SUBPOPULATIONEN

Die drei gebildeten T-Zellsubpopulationen haben unterschiedliche Funktionen im Körper. Effektorzellen ( $T_{EC}$ ) und Effektorgedächtniszellen ( $T_{EM}$ ) sind überwiegend im peripheren Gewebe lokalisiert, haben sofortige Effektorfunktion und sind in der Lage,  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$  zu produzieren.  $T_{EM}$  sind im Gegensatz zu  $T_{EC}$  langlebige Zellen, die nach Antigenkontakt sofortige Effektorfunktion erhalten.  $T_{CM}$ , die zentralen Gedächtniszellen sind hauptsächlich in lymphatischem Gewebe zu finden. Diese Zellen haben keine direkten Effektorfunktionen. Es sind langlebige Zellen, die eine starke Fähigkeit zur Proliferation und Selbsterneuerung besitzen. Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, konnten nach einer Immunisierung mit  $\Delta yopP(LLO)$  in der Milz überwiegend  $T_{EM}$ -Zellen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde neben der Milz nun zusätzlich die Lymphknoten und die Lunge auf das Vorhandensein von  $LLO_{91-99}$ -spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen überprüft. Die Lymphknoten und die Milz gehören zu den sekundären lymphatischen Organen, in denen die Initiierung und Entwicklung der T-Zellen stattfindet. Neben diesen lymphatischen Organen wurde repräsentativ als nicht-lymphatisches Organ die Lunge untersucht.

Es wurden Mäuse mit dem Impfstamm  $\Delta yopP(LLO)$  und der Negativkontrolle  $\Delta yopP$ , der kein heterologes Antigen exprimiert, immunisiert und die Lymphozyten der Milz, Lymphknoten und Lunge in Woche 1, 2, 3 und 4 nach Immunisierung isoliert und mit Tetramer, CD8-, CD127- und CD62L-Antikörpern gefärbt. Danach wurde die absolute Zellzahl der  $LLO_{91-99}$ -spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen, sowie die absolute und relative Verteilung der Subpopulationen bestimmt.

Betrachtet man nun zuerst die Kinetik der absoluten Zellzahlen aller  $LLO_{91-99}$ -spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen in den drei Organen in Woche 1, 2, 3 und 4 nach Immunisierung kann man deutliche Unterschiede in der Zellzahl erkennen. Wie in Abbildung C 10 dargestellt, konnte aus der Lunge die größte Menge  $LLO_{91-99}$ -spezifischer  $CD8^+$  T-Zellen isoliert werden. Der größte Unterschied lag in Woche 2 vor; Hier konnten in der Lunge  $2,9 \times 10^5$ , in der Milz  $2,9 \times 10^4$ , und im Lymphknoten  $1,0 \times 10^4$   $LLO_{91-99}$ -spezifische  $CD8^+$  T-Zellen detektiert werden.

## C Ergebnisse



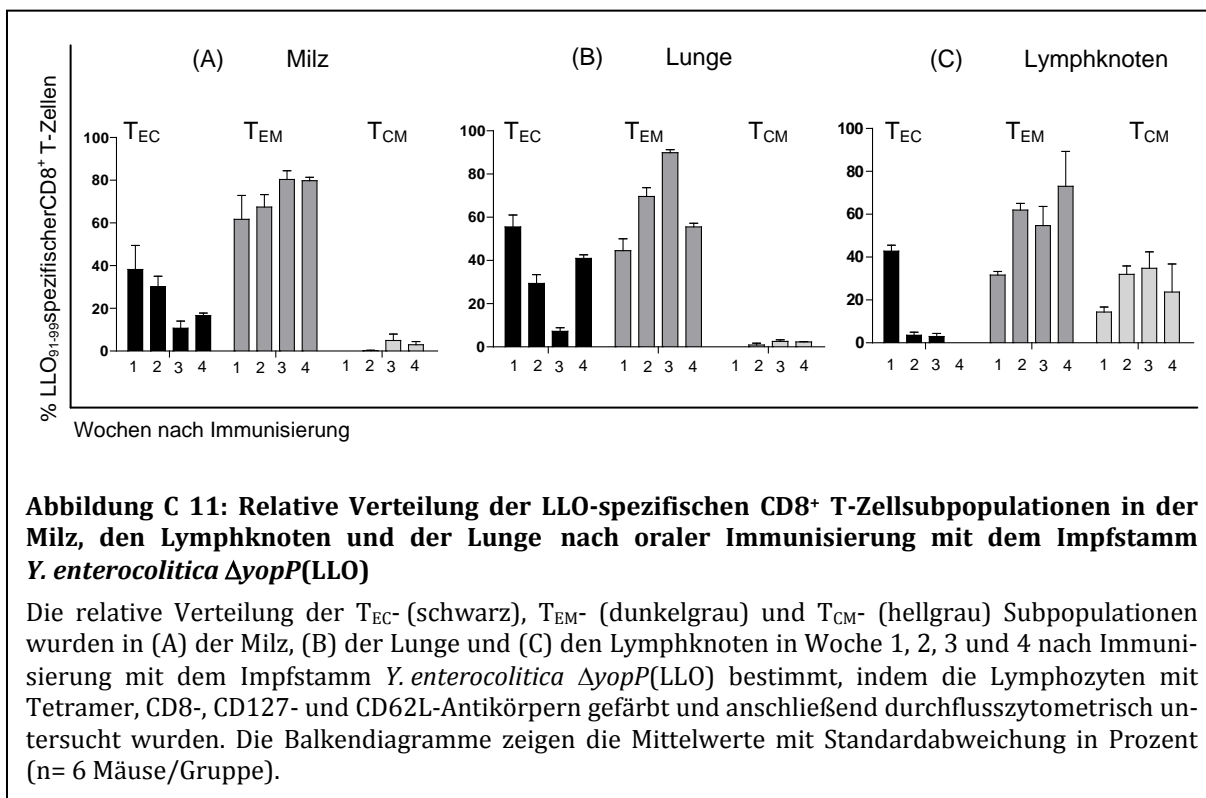
Die Verteilung der drei Subpopulationen in den Organen wurde als relative (Abbildung C 11) und absolute Verteilung (Abbildung C 12) bestimmt. Die absolute Zellzahl ermöglicht dabei eine bessere Prognose für die Schutzwirkung des Lebendvektors.

Die relative Anzahl der **T<sub>EC</sub>-Subpopulation** (schwarze Balken) lag in Woche 1 nach Immunisierung in allen drei Organen bei etwa 40 % (Milz 38 %, Lunge 55 %, LK 45 %). Danach unterscheidet sich die Entwicklung: In der Milz sinkt der T<sub>EC</sub>-Anteil in Woche 2 auf 30 %, Woche 3 auf 10 %, bis auf 16 % in Woche 4. In der Lunge bleibt die Anzahl der T<sub>EC</sub> bis in Woche 4 hoch (29 %, 7 % und 40 %). In den Lymphknoten dagegen lassen sich ab Woche 2 keine T<sub>EC</sub> mehr nachweisen (2,5 %, 3,9 %, 0 %).

Die **T<sub>EM</sub>-Subpopulation** (dunkelgraue Balken) ist in allen drei Organen der dominierende Zelltyp. In der Milz wurden Werte von 61 % in Woche 1, 67 % in Woche 2, 80 % in Woche 3 und 79 % in Woche 4 erreicht. In der Lunge steigt die T<sub>EM</sub>-Population von 44 % in Woche 1 bis zu ihrem Maximum von 90 % in Woche 3, um dann in Woche 4 einen Wert von 55 % zu erreichen. Auch in den Lymphknoten ist die T<sub>EM</sub>-Population mit 33 %, 61 %, 54 % und 73 % die am stärksten vertretene Gruppe.

Die **T<sub>CM</sub>-Subpopulation** (hellgrauer Balken) ist in Milz und Lunge nur schwach vertreten. Sie erreicht Maximalwerte von 5 %. In den Lymphknoten können dagegen bis zu 35 % nachgewiesen werden.

## C Ergebnisse



Neben der relativen Verteilung der LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen T<sub>EC</sub>, T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> wurden auch deren absoluten Zellzahlen in der Milz, Lunge und den Lymphknoten bestimmt. Die absolute Menge der LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen T<sub>EC</sub>, T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> der drei Organe in Woche 1, 2, 3 und 4 nach Immunisierung ist in Abbildung C 12 dargestellt:

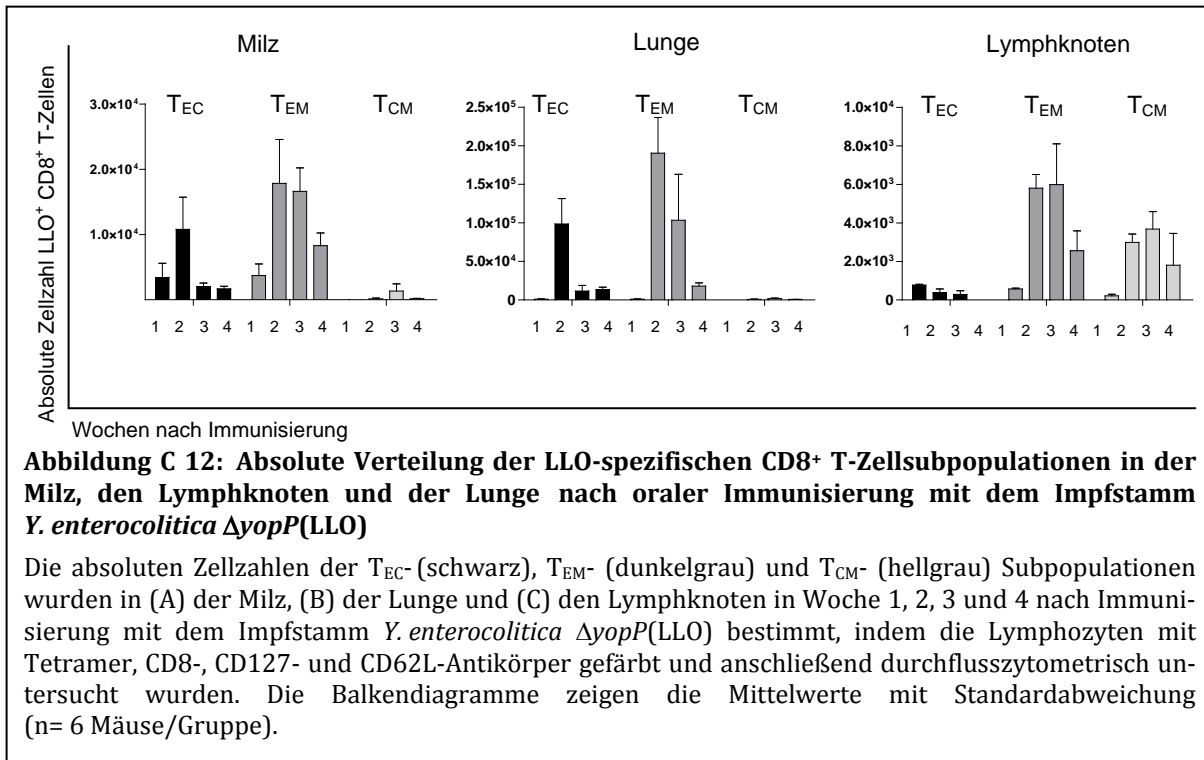
In **Woche 1** nach Immunisierung konnten sowohl in der Milz, als auch in Lunge und Lymphknoten, nur eine geringe Anzahl aller LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Subpopulationen detektiert werden. Es kamen in der Milz  $3,4 \times 10^3$  T<sub>EC</sub>,  $3,7 \times 10^3$  T<sub>EM</sub> und 0 T<sub>CM</sub> vor, in der Lunge 990 T<sub>EC</sub>, 891 T<sub>EM</sub> und 0 T<sub>CM</sub> und in den Lymphknoten 741 T<sub>EC</sub>, 542 T<sub>EM</sub> und 272 T<sub>CM</sub>.

In **Woche 2** kam es in allen drei Organen zur Expansion: In Milz, Lunge und Lymphknoten wurden hauptsächlich T<sub>EM</sub>-Zellen detektiert ( $1,8 \times 10^4$ ,  $1,9 \times 10^5$ ,  $5,8 \times 10^3$ ), T<sub>EC</sub> konnten nur aus Milz und Lunge isoliert werden ( $1,1 \times 10^4$  und  $9,9 \times 10^4$ ) und T<sub>CM</sub> kamen nur in den Lymphknoten vor ( $3,0 \times 10^3$ ).

In **Woche 3** kam es in Milz und Lunge zu einem starken Abfall der T<sub>EC</sub> und geringem Abfall der T<sub>EM</sub>-Population. In den Lymphknoten konnten ähnliche Werte wie in Woche 2 erreicht werden (Werte s. Abbildung C 12).

## C Ergebnisse

In **Woche 4** kommt es zu einem starken Abfall der T-Zellpopulationen in allen drei Organen. Die  $T_{EC}$ -Subpopulation ist in Milz und Lymphknoten kaum mehr nachweisbar ( $1,7 \times 10^3$  und  $1,3 \times 10^4$ ).  $T_{EM}$  sind in Milz, Lunge und Lymphknoten ( $8,3 \times 10^3$ ,  $1,8 \times 10^4$  und  $2,5 \times 10^3$ ) vorhanden.  $T_{CM}$ -Zellen kommen mit  $1,8 \times 10^3$  Zellen am meisten in den Lymphknoten vor. In der Milz und der Lunge konnte eine geringere Anzahl an  $T_{CM}$  isoliert werden ( $1,7 \times 10^2$  und  $6,7 \times 10^2$ ).



Die Untersuchung der Milz, Lunge und Lymphknoten zeigen, dass in allen drei Organen LLO<sub>91-99</sub>-spezifische CD8 T-Zellen isoliert werden konnten. Die größte Anzahl war in der Lunge nachweisbar. Dabei wurden alle Subpopulationen LLO<sub>91-99</sub>-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen gebildet.  $T_{EC}$ -Zellen wurden hauptsächlich in Milz und Lunge detektiert, die höchste Zellzahl lag hier in Woche 2 vor. Die  $T_{EM}$ -Subpopulation war, wie schon für die Milz gezeigt, auch in der Lunge und den Lymphknoten die am stärksten vertretene Population. Die  $T_{CM}$ -Subpopulation konnte in jedem Organ nachgewiesen werden, der höchste Anteil war jedoch in den Lymphknoten zu finden.

#### C.7.4 BILDUNG $IFN\gamma$ -PRODUZIERENDER $CD8^+$ T-ZELLEN

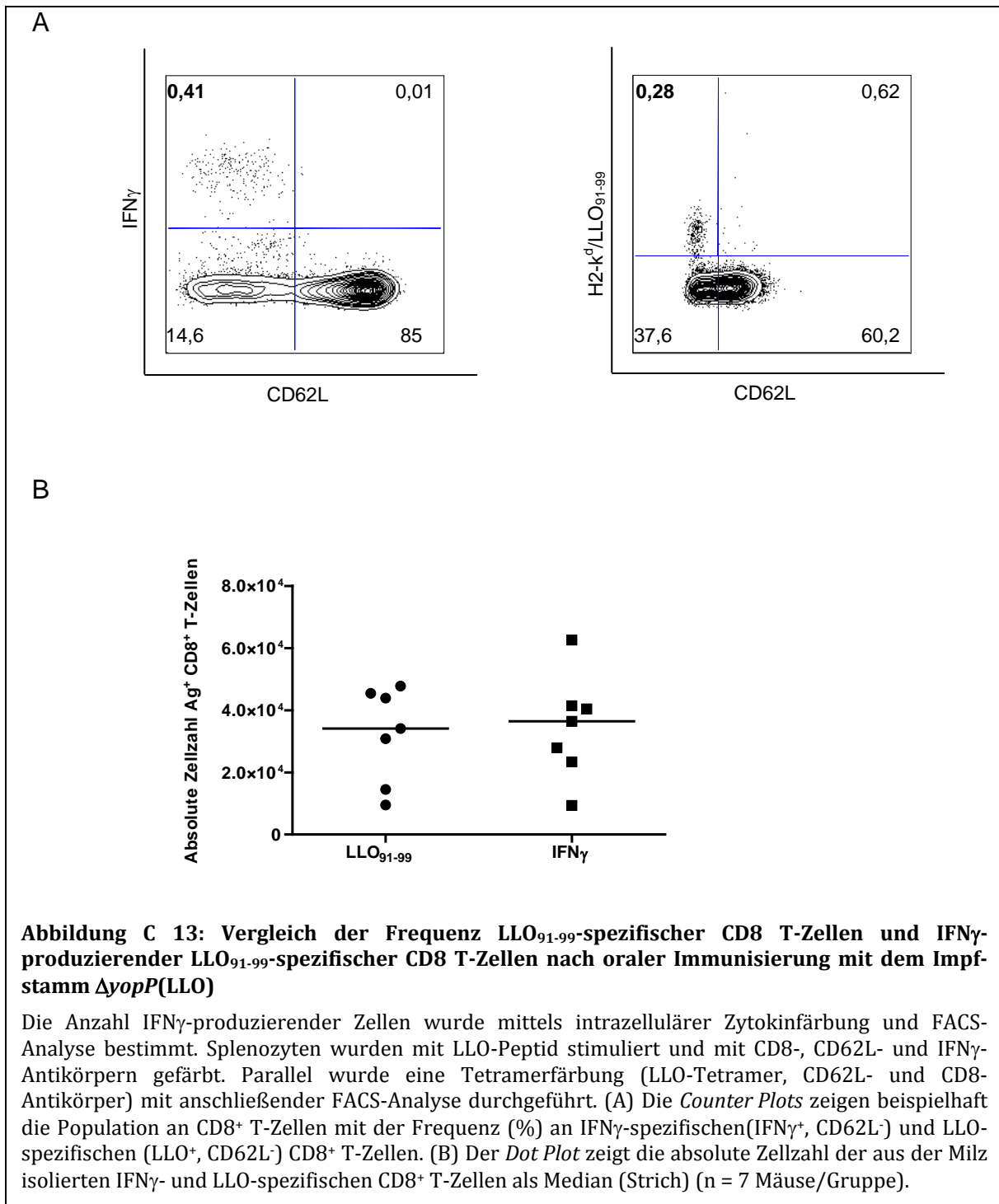
LLO-spezifische  $CD8^+$  T-Zellen wurden mittels Tetramertechnologie und FACS-Analyse identifiziert. Eine andere Möglichkeit ist die Identifizierung mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (ICC). Bei der ICC wird die durch Restimulierung der LLO-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen mit dem spezifischen Antigen (LLO) gebildete  $IFN\gamma$ -Menge gemessen. Auf diese Weise kann somit auch die Funktionalität der T-Zellen überprüft werden.  $IFN\gamma$  ist ein Zytokin, das von aktivierten T-Zellen produziert wird und antimikrobielle Effekte vermittelt.  $IFN\gamma$  vermittelt das Anlocken von Leukozyten und Makrophagen, und führt zu Wachstum, Reifung und Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen, wie Natürlichen Killerzellen und B-Zellen (155).

Um zu klären, ob es sich bei den aktivierten  $LLO^+ CD8^+$  T-Zellen um CTLs mit Effektorfunktion handelt, die in der Lage sind  $IFN\gamma$  zu bilden und somit die Immunantwort zu modulieren, wurden Splenozyten 4 Wochen nach Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP(LLO)$  isoliert und eine intrazellulärer Zytokinfärbung (ICC) parallel zu einer Tetramerfärbung (s. C.4) durchgeführt. Für die ICC wurden die Splenozyten mit dem  $LLO_{91-99}$ -Peptid stimuliert, um so die  $IFN\gamma$ -Produktion anzuregen. Danach wurde mit Antikörpern, spezifisch für  $CD8$ ,  $IFN\gamma$  und  $CD62L$  gefärbt. Als Negativkontrollen wurden die Milzzellen zum einen mit  $LLO_{91-99}$ -Peptid stimuliert und mit einem Isotyp-Antikörper gefärbt, und zum anderen mit Acetonitril stimuliert und wie die  $LLO_{91-99}$ -stimulierten Proben behandelt. Die Daten werden nicht gezeigt ( $IFN\gamma^+ CD8^+$  T-Zellen < 0,05 %).

Es konnte eine Frequenz von 0,28 % LLO-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen und 0,41 %  $IFN\gamma$ -produzierenden  $CD8^+$  T-Zellen detektiert werden, wie in Abbildung C 13 A exemplarisch dargestellt ist.

Vergleicht man die absolute Zellzahl  $IFN\gamma$ -produzierender Zellen ( $3,6 \times 10^4$ ) mit den detektierten  $LLO^+ CD8^+$  T-Zellen ( $3,1 \times 10^4$ ) ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen ( $P \geq 0,05$ ) (s. Abbildung C 13 B). Die durch orale Immunisierung generierten LLO-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen sind in der Lage,  $IFN\gamma$  zu produzieren.

## C Ergebnisse



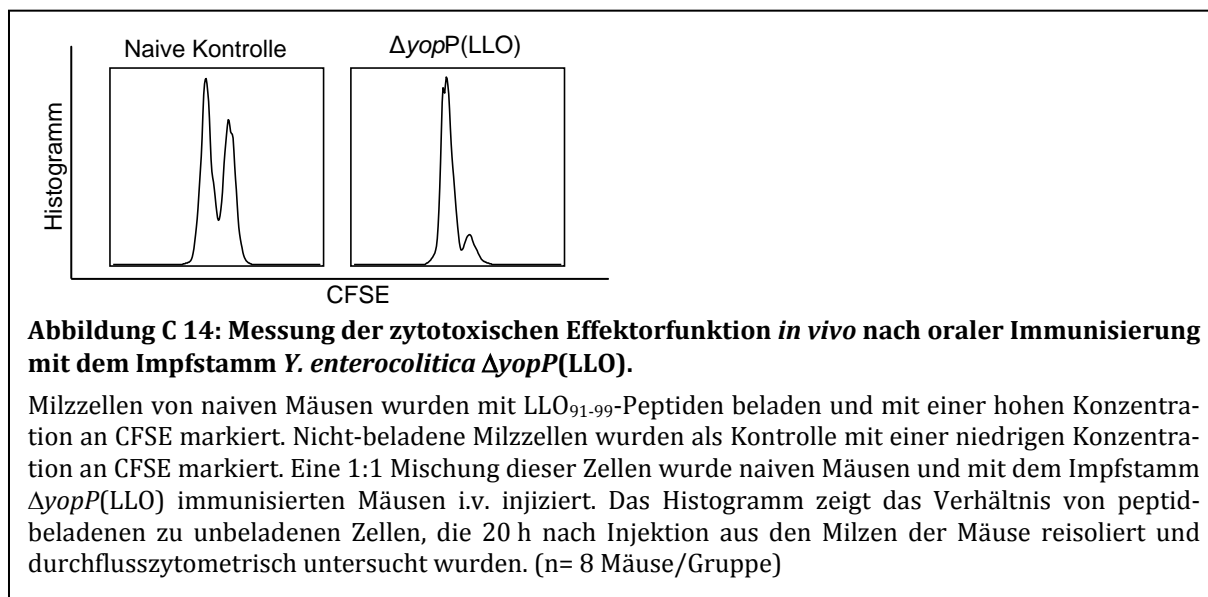


## C.7.5 EFFEKTORFUNKTION DER CTLs IN VIVO

Die Fähigkeit der LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8 T-Zellen, IFN $\gamma$  zu produzieren wurde *ex vivo* nachgewiesen. Neben dieser Fähigkeit haben CTLs zytotoxische Funktionen und können durch die Bildung von Granzym und Perforin zu Apoptose bzw. Lyse der infizierten Zelle führen.

Die zytotoxische Aktivität der antigenspezifischen T-Zellen wurde nun *in vivo* überprüft. Dazu wurde 4 Wochen nach Immunisierung mit dem Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP(LLO)$  ein *in vivo* Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Wie in Kapitel B.15.3 beschrieben, wurden mit LLO<sub>91-99</sub>-Peptid beladene und nicht-beladene Splenozyten in immunisierte und naive Mäuse injiziert, aus der Milz reisoliert und deren Quantität nach 20 h bestimmt. Die Unterscheidung zwischen mit LLO<sub>91-99</sub>-Peptid beladenen und unbeladenen Zellen, erlaubt die Färbung mit unterschiedlichen Konzentrationen an CFSE. Aus dem Verhältnis dieser beiden Zellpopulationen aus immunisierten Mäusen und nicht-immunisierten Mäusen wurde die spezifische Lyse (s. B.15.3) berechnet.

Mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP(LLO)$  immunisierte Mäuse haben eine spezifische Lyse von 63,6 %. Wie in Abbildung C 14 zu erkennen ist, hat sich die Anzahl der mit LLO<sub>91-99</sub>-beladenen Zellen (CFSE<sub>hoch</sub>) im Vergleich zu den nicht-beladenen Zellen (CFSE<sub>niedrig</sub>) verringert. Dies ist bei den naiven Mäusen nicht der Fall. Übereinstimmend mit den detektierten Tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen konnten eine zytotoxische Effektorfunktion der LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* nachgewiesen werden.



### C.7.6 PROLIFERATIONSVERMÖGEN

Es konnte bisher gezeigt werden, dass LLO<sub>91-99</sub>-spezifische CD8 T-Zellen gebildet werden, die in der Lage sind, Mäuse vor einer Infektion mit *L. monocytogenes* zu schützen. Dabei werden neben Effektorzellen (T<sub>EC</sub>), Effektor- und zentrale Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub>) gebildet, die Langzeitschutz vermitteln. Für eine volle Funktionsfähigkeit müssen die Gedächtniszellen nach Antigenkontakt zur Proliferation fähig sein. T<sub>CM</sub>-Zellen haben die stärkste Proliferationsfähigkeit, T<sub>EM</sub>-Zellen können schwach proliferieren, wohingegen T<sub>EC</sub>-Zellen nicht in der Lage sind zu proliferieren (88). Um zu prüfen, ob die durch Immunisierung mit  $\Delta yopP(LLO)$  generierten LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen diese Fähigkeit besitzen, wurde ein Proliferationsassay mit BrdU durchgeführt. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, das sich bei der DNA-Synthese in den DNA-Strang einlagert. Durch Färbung mit einem spezifischen anti-BrdU-fluoreszenzmarkierten Antikörper können so neugebildete Zellen detektiert werden.

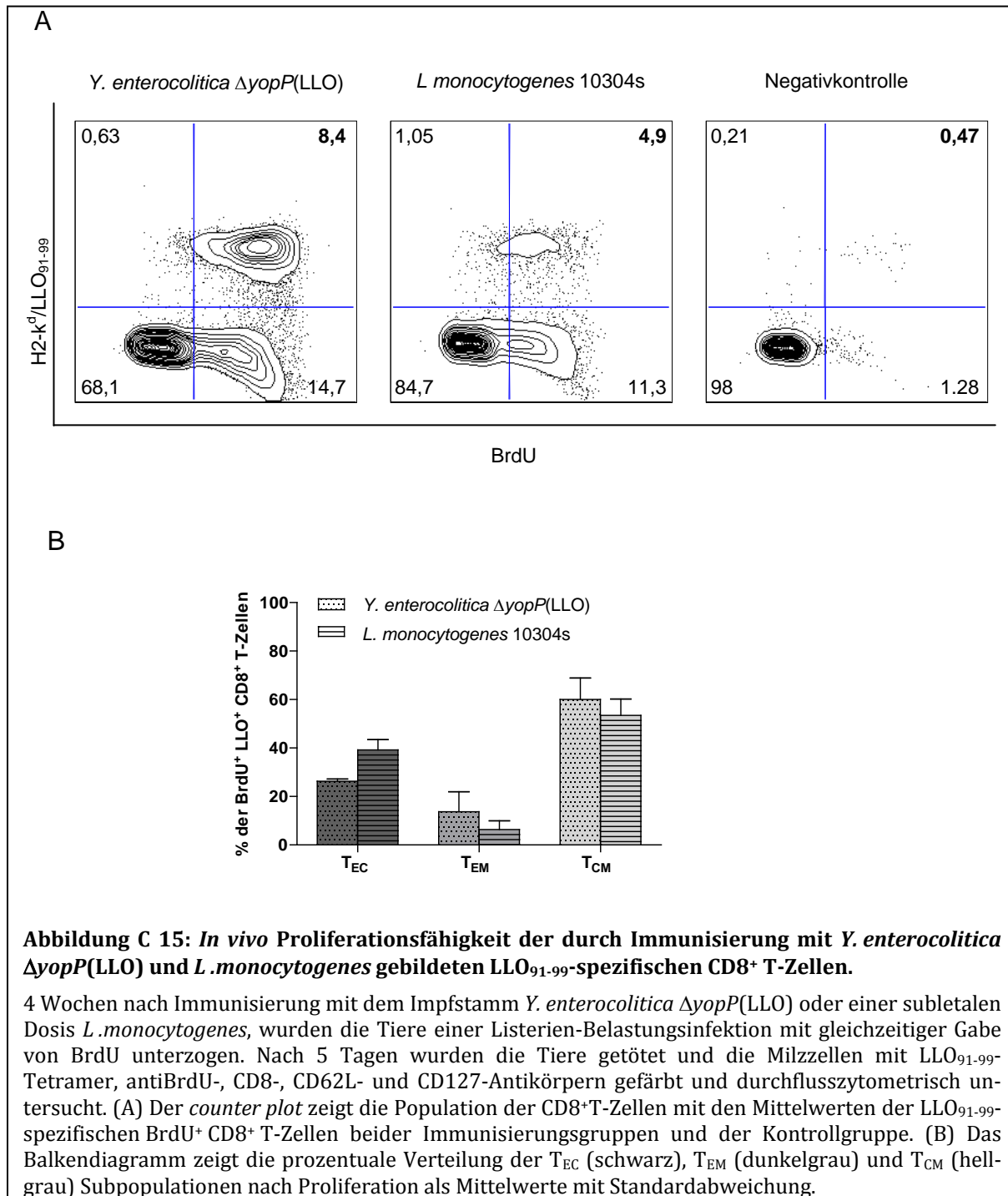
Es wurden Mäuse mit  $\Delta yopP(LLO)$  und - als Kontrollen - mit  $\Delta yopP$  und *L. monocytogenes* 10304s immunisiert und nach 4 Wochen mit einer letalen Dosis *L. monocytogenes* infiziert. Zusätzlich wurde den Tieren BrdU intraperitoneal injiziert und über das Trinkwasser verabreicht. 5 Tage nach Infektion wurden die Milzzellen isoliert und mit fluoreszenzmarkierten anti-BrdU-Antikörper, LLO<sub>91-99</sub>-Tetramer und den Antikörpern, die gegen die Oberflächenmarker CD8, CD127 und CD62L gerichtet sind, gefärbt. Dadurch wurden BrdU<sup>+</sup> LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt (Abbildung C 15 A):

Bei der mit  $\Delta yopP(LLO)$  immunisierten Gruppe konnten 8,4 %  $\pm$  5,9 % LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die BrdU in die DNA eingebaut hatten, detektiert werden. Bei Immunisierung mit *L. monocytogenes* wurde eine Frequenz von 4,9 %  $\pm$  1,3 % ermittelt. Zwischen den beiden Immunisierungsgruppen liegt kein signifikanter Unterschied vor ( $P > 0,05$ ). Das bedeutet, dass die durch Immunisierung mit  $\Delta yopP(LLO)$  gebildeten LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (s. Kapitel C.4 und C.6.1) dieselbe Fähigkeit zur Proliferation haben, wie durch Immunisierung mit *L. monocytogenes* generierte CTLs.

Die relative Verteilung der LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen BrdU<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen ist in Abbildung C 15 B dargestellt. Die LLO<sup>+</sup> BrdU<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen der mit *L. monocytogenes* immunisierten Kontrollgruppe setzen sich zu 40 % aus T<sub>EC</sub>, zu 6,4 % aus T<sub>EM</sub> und zu 53 % aus T<sub>CM</sub> zusammen. In den mit dem Impfstamm  $\Delta yopP(LLO)$  immunisierten Mäusen wurden 26 % T<sub>EC</sub>, 13,4 % T<sub>EM</sub> und 60 % T<sub>CM</sub> nachgewiesen. Vergleicht man von bei-

## C Ergebnisse

den Immunisierungsgruppen die jeweiligen Ergebnisse der Subpopulationen mittels Mann-Whitney-Test, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ( $P > 0,05$ ). Die  $T_{CM}$ -Subpopulation ist die größte, gefolgt von den  $T_{EC}$ -Zellen.  $T_{EM}$ -Zellen lassen sich kaum nachweisen.



## C.8 DER IMPFSTAMM *Y. ENTEROCOLITICA* IM VERGLEICH MIT DEM IMPFSTAMM *S. TYPHIMURIUM*

In unserem Labor, wurde nicht nur gezeigt, dass der Impfstamm *Yersinia enterocolitica*  $\Delta yopP$ , der das Fusionsprotein YopE/LLO/M45 exprimiert, eine zytotoxische Immunantwort hervorruft, sondern auch der Impfstamm *Salmonella typhimurium* SB824. Dieser ist wie der *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ -Impfstamm in der Lage, mittels T3SS heterologe Antigene in Wirtszellen zu translozieren und MHC Klasse I-restringent zu präsentieren (144;145).

Um das Potenzial beider Impfstämme als neuartige Lebendträgerimpfstoffe zu vergleichen, wurden Immunisierungsstudien mit beiden Impfstämmen durchgeführt. Neben der Charakterisierung der zytotoxischen T-Zellantwort, wurde deren Schutzwirkung bestimmt und die Virulenz der beiden Impfstämme im Mausmodell verglichen.

### C.8.1 DER IMPFSTAMM *S. TYPHIMURIUM*

Der Stamm *Salmonella typhimurium* SB824 ist ein durch Mutationen der *aroA*- und *sptP*-Gene attenuierter Impfstamm (82). Dieser Stamm wurde mit dem Expressionsvektor pHR231 transformiert, welcher wie der Expressionsvektor pHR430 aus dem Fusionsprotein YopE/LLO/M45 sowie dem Chaperon SycE aufgebaut ist (s. auch Abbildung C 1) (144). Damit das Fusionsprotein und das Chaperon in *S. typhimurium* SB824 exprimiert werden können, steht ihre Transkription jedoch unter Kontrolle des *lac*-Promotors (144).

Das Konstrukt *S. typhimurium* SB824 (YopE/LLO/M45) lag zu Beginn meiner Arbeit vor. Die T3SS-abhängige Sekretion des Fusionsproteins wurde wie in Kapitel C.2 beschrieben mittels Immunoblot gezeigt (Daten nicht abgebildet).

### C.8.2 VIRULENZ IM MAUSMODELL

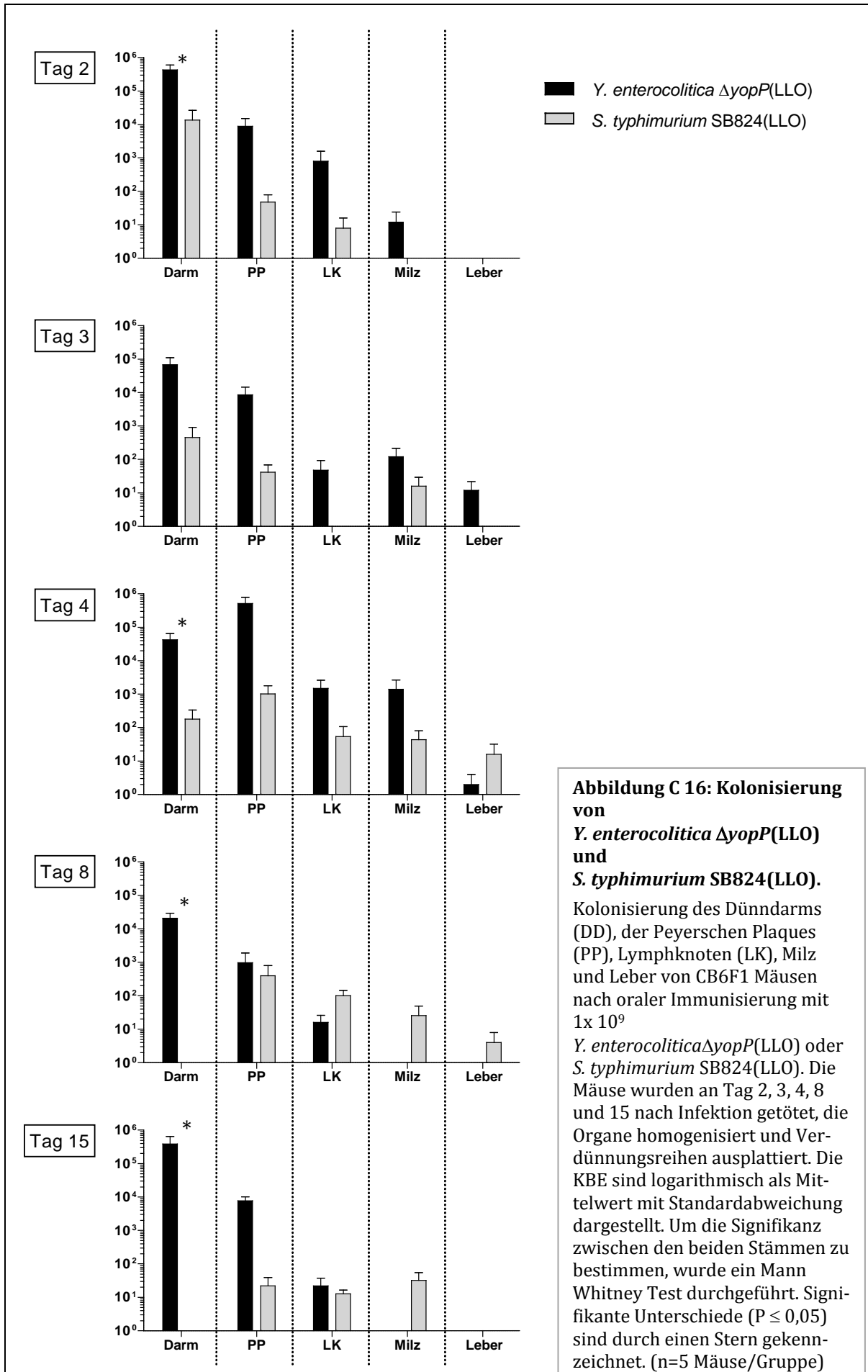
Um die Persistenz beider Impfstämme im CB6F1-Mausmodell im Vergleich zu zeigen, wurde eine Kolonisierungsstudie durchgeführt. Dazu wurden Gruppen von je 5 CB6F1-Mäusen mit  $1 \times 10^9$  KBE des *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO)- und *S. typhimurium* SB824(LLO)- Impfstammes oral immunisiert. An den Tagen 2, 3, 4, 8 und 15 wurden die Anzahl der überlebenden Bakterien im Dünndarm, den Peyerschen Plaques, Lymphknoten, Milz und Leber bestimmt, indem Verdünnungsreihen ausgezählt wurden. Das Detektionslimit liegt bei 100 KBE für den Dünndarm, 50 KBE für die Leber und 10 KBE für Milz, Lymphknoten und Peyerschen Plaques. Die Ergebnisse sind als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung in Abbildung C 16 dargestellt:

Nach oraler Immunisierung mit dem **Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO)** konnten zu allen Zeitpunkten Bakterien aus dem Dünndarm, den Peyerschen Plaques und den Lymphknoten isoliert werden. Aus der Milz wurden von Tag 2 bis Tag 4 Bakterien isoliert, wobei der Maximalwert an Tag 3 ( $3 \times 10^2$  KBE) erreicht wurde. Die Besiedelung der Leber erfolgte nur vereinzelt an Tag 3 und 4.

Bei oraler Immunisierung mit dem **Impfstamm *S. typhimurium* SB824(LLO)** konnten aus dem Dünndarm von Tag 2 ( $5 \times 10^3$  KBE) bis Tag 4 Bakterien isoliert werden. Die Peyerschen Plaques waren an allen Tagen besiedelt, das gleiche gilt für die Lymphknoten, aus denen jedoch an Tag 3 keine Salmonellen isoliert werden konnten. Aus der Milz konnten ab Tag 3 Bakterien isoliert werden, die bis Tag 15 nachgewiesen werden konnten. Die Leber war von Tag 4 bis Tag 8 besiedelt.

Der Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) ließ sich zu jedem Zeitpunkt aus dem Darm isolieren, wohingegen *S. typhimurium* SB824(LLO) hier nur bis Tag 4 nachweisbar war. *S. typhimurium* besiedelte allerdings die Milz länger als *Y. enterocolitica*, die nur bis Tag 4 aus der Milz isoliert werden konnte.

## C Ergebnisse



**Abbildung C 16: Kolonisierung von *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP(LLO)$  und *S. typhimurium* SB824(LLO).**

Kolonisierung des Dünndarms (DD), der Peyerschen Plaques (PP), Lymphknoten (LK), Milz und Leber von CB6F1 Mäusen nach oraler Immunisierung mit  $1 \times 10^9$  *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP(LLO)$  oder *S. typhimurium* SB824(LLO). Die Mäuse wurden an Tag 2, 3, 4, 8 und 15 nach Infektion getötet, die Organe homogenisiert und Verdünnungsreihen ausplattiert. Die KBE sind logarithmisch als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Um die Signifikanz zwischen den beiden Stämmen zu bestimmen, wurde ein Mann Whitney Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede ( $P \leq 0,05$ ) sind durch einen Stern gekennzeichnet. (n=5 Mäuse/Gruppe)

### C.8.3 CHARAKTERISIERUNG DER CD8 T-ZELLANTWORT

Um den Einfluss der unterschiedlichen Kolonisierung der Impfstämme *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) und *S. typhimurium* SB824(LLO) auf die T-Zellantwort zu vergleichen, wurde die Entwicklung der LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sowie die Verteilung der Subpopulationen T<sub>EC</sub>, T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dazu wurden je 2 Gruppen CB6F1-Mäuse mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) oder *S. typhimurium* SB824(LLO) mit einer KBE von  $1 \times 10^9$  oral immunisiert, die Milzen wurden in Woche 1, 2, 3 oder 4 nach Immunisierung entnommen, die Lymphozyten aufgereinigt und mit LLO-Tetramer, CD8-, CD127- und CD62L-Antikörper gefärbt. Danach wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

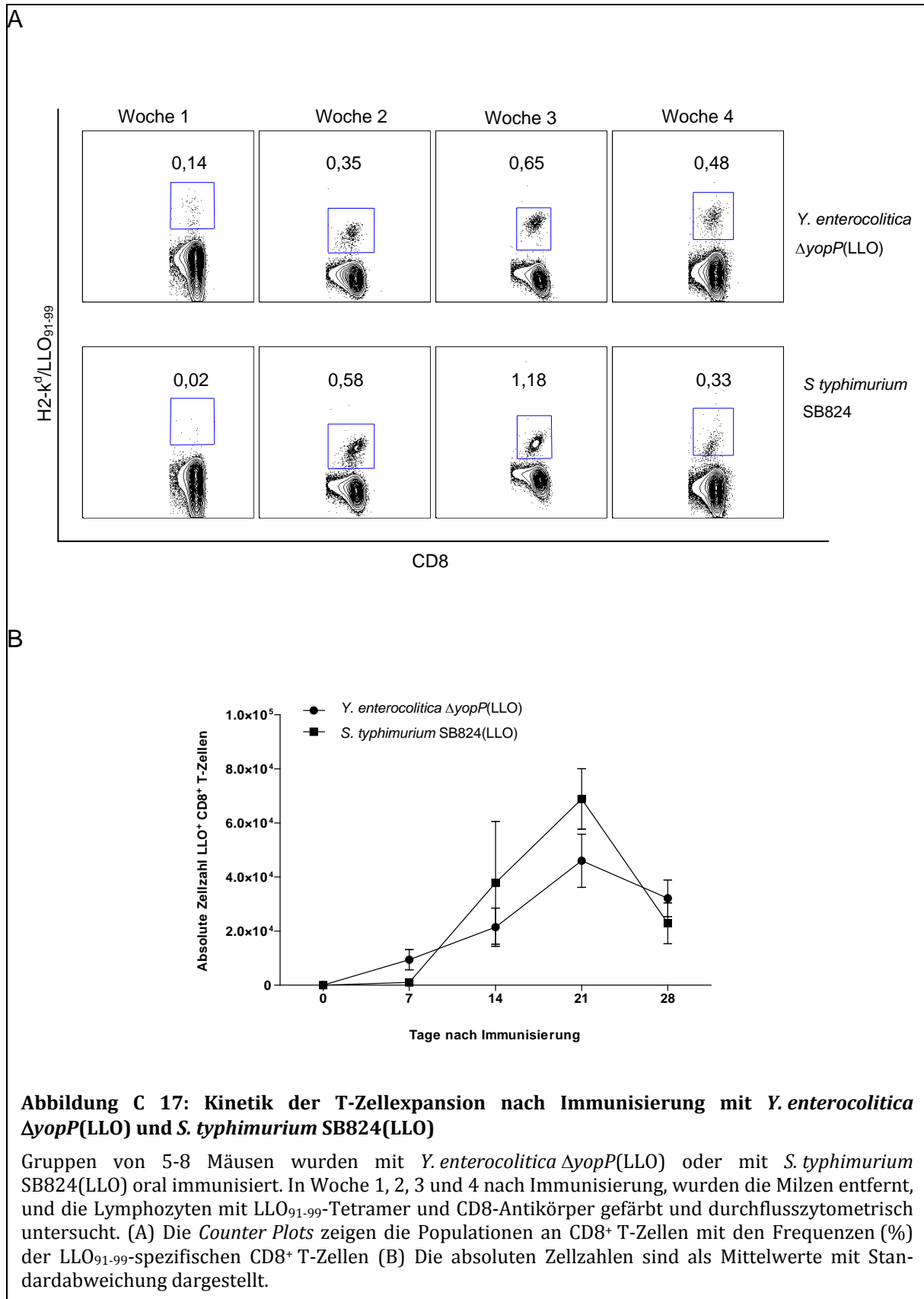
Die Kinetik der T-Zellenwicklung ist als *Counter Plot* mit den LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellfrequenzen (%) (Abbildung C 17 A) und als Diagramm mit den absoluten Zellzahlen (Abbildung C 17 B) als Mittelwerte dargestellt.

Die *Counter Plots* (Abbildung C 17 A) zeigen deutlich, dass nach Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $yopP$ (LLO) in der ersten Woche LLO<sub>91-99</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (0,14 %) isoliert wurden, nach Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824(LLO) konnten in der ersten Wochen keine LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (0,02 %) isoliert werden. Hier konnten erst in Woche 2 LLO<sub>91-99</sub>-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden (0,58 %). Das Maximum der T-Zellexpansion wird bei beiden Immunisierungsgruppen in der dritten Woche erreicht.

Auch die absoluten Zellzahlen (Abbildung C 17 B) zeigen, dass nach Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) die spezifische T-Zellantwort in der ersten Woche und nach Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824(LLO) in der zweiten Woche einsetzt und in der dritten Woche nach Immunsierung in beiden Immunisierungsgruppen das Maximum erreicht.

Vergleicht man die gebildeten LLO<sub>91-99</sub> spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen der beiden Impfstämme mittels Mann Whitney Test, kann zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $P > 0,05$ ). Damit unterscheiden sich die beiden Impfstämme hinsichtlich der Quantität der T-Zellantwort nicht.

## C Ergebnisse





## C Ergebnisse

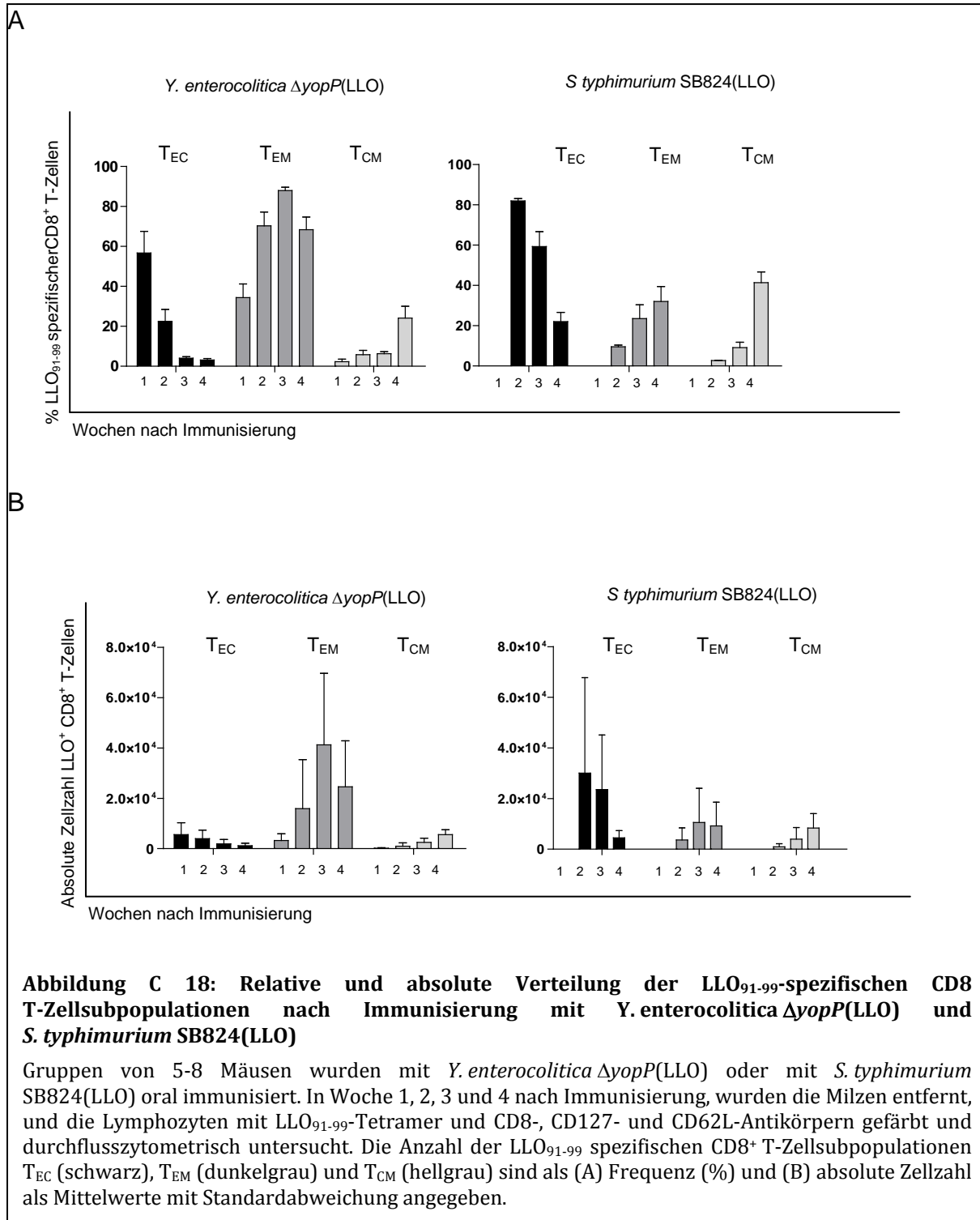
In Abbildung C 18 sind die Unterschiede beider Immunisierungsgruppen in der Verteilung der LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8 T-Zellsubpopulationen dargestellt. Es wurde das relative Verhältnis, sowie die absoluten Zellzahlen der Effektorzellen ( $T_{EC}$ ), Effektorgedächtniszellen ( $T_{EM}$ ) und zentralen Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ ) bestimmt.

Wie schon beschrieben wurde, ist die geringe Anzahl an der  $T_{EC}$ -Zellen und die starke Präsenz der  $T_{EM}$ -Subpopulation charakteristisch nach Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO). Nach Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824(LLO) setzt die LLO<sub>91-99</sub>-spezifische CD8 T-Zellantwort erst in Woche 2 nach Immunisierung ein. Die somit zeitversetzte Immunantwort besteht in der zweiten Woche aus 81 %  $T_{EC}$ , 10 %  $T_{EM}$  und 2,6 %  $T_{CM}$ . Der Anzahl der  $T_{EC}$ -Subpopulation sinkt dann zugunsten der  $T_{EM}$ - und  $T_{CM}$ -Subpopulationen, die beide bis in Woche 4 ansteigen. D.h., das im Gegensatz zur Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) eine höhere Anzahl an  $T_{EC}$  und geringere Anzahl an  $T_{EM}$  vorliegt.

Betrachtet man die absoluten Zellzahlen, zeigt sich, dass bei einer Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824(LLO) hauptsächlich  $T_{EC}$  gebildet werden ( $3,0 \times 10^4$ ), wohingegen bei Immunisierungen mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) die  $T_{EM}$  zahlenmäßig überwiegen ( $4,1 \times 10^4$ ).

In beiden Immunisierungsgruppen werden alle drei LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8 T-Zellsubpopulationen  $T_{EC}$ ,  $T_{EM}$  und  $T_{CM}$  gebildet. Bei *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) sind die  $T_{EM}$ -Zellen die größte Gruppe, wohingegen bei Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824(LLO) die  $T_{EC}$ -Subpopulation überwiegt. Zentrale Gedächtniszellen sind in Woche 4 in beiden Gruppen nachweisbar.

## C Ergebnisse



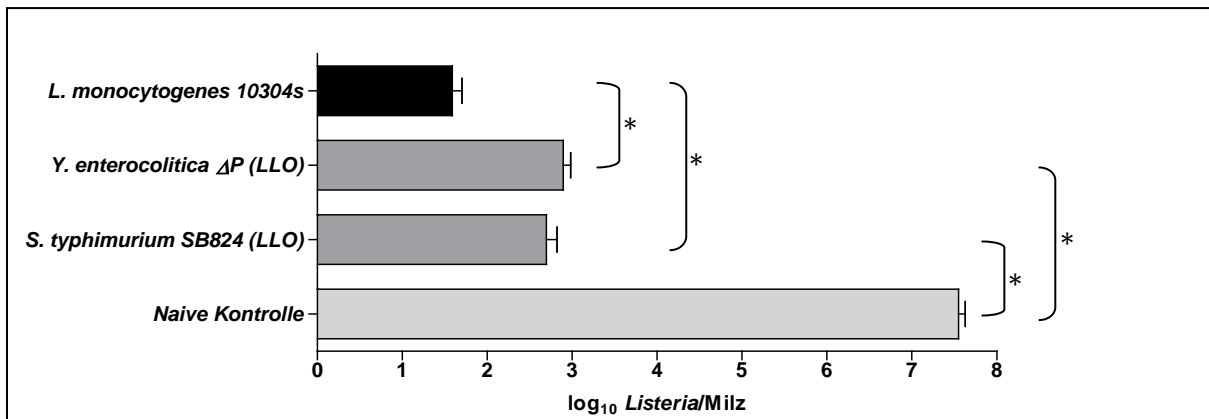
#### C.8.4 SCHUTZVERSUCH

Um zu bestimmen, ob sich die unterschiedliche Verteilung der LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8 T-Zellsubpopulationen T<sub>EC</sub>, T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> auf den Schutz auswirkt, wurde eine Belastungsinfektion mit einer letalen Dosis *L. monocytogenes* durchgeführt.

Dazu wurden Gruppen von je 8 CB6F1-Mäusen mit je  $1 \times 10^9$  *Y. enterocolitica*  $\Delta$ yopP(LLO) oder *S. typhimurium* SB824(LLO) oral immunisiert. Als Kontrolle wurden Mäuse mit  $1 \times 10^3$  *L. monocytogenes* 10304s intraperitoneal immunisiert. Die Immunisierungsgruppen sowie eine Gruppe naiver Mäuse wurden mit einer letalen Dosis von  $1 \times 10^5$  *L. monocytogenes* 10403s i.v. infiziert. Drei Tage nach der Belastungsinfektion wurden die Milzen homogenisiert und die KBE der überlebenden Listerien bestimmt (s. Abbildung C 19).

Bei der mit einer subletalen *L. monocytogenes*-Dosis immunisierten Kontrollgruppe wurden  $39 \pm 32$  Bakterien/Milz isoliert. Die naiven Mäuse hingegen waren vollkommen ungeschützt gegenüber der Listerien-Infektion. Es konnten  $3,5 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^7$  KBE in den Milzen detektiert werden. In den mit dem Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta$ yopP(LLO) immunisierten Mäusen wurden  $786 \pm 501$  *Listeria* reisoliert; Bei Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824(LLO) wurden  $496 \pm 410$  KBE isoliert, das ist 1 log<sub>10</sub> Stufe mehr als bei der mit Listerien immunisierten Kontrollgruppe und 5 log<sub>10</sub> Stufen weniger als bei den naiven Mäusen. Somit liegt bei einer Immunisierung mit  $\Delta$ yopP(LLO) und SB824(LLO) Schutz gegenüber einer Listerieninfektion vor. Zwischen den Immunisierungsgruppen Listerien/SB824(LLO) und Listerien/ $\Delta$ yopP(LLO) liegt ein signifikanter Unterschied ( $P > 0,05$ ) vor, zwischen SB824(LLO)/ $\Delta$ P(LLO) gibt es keinen signifikanten Unterschied (s. Sterne in Abbildung C 19). Die beiden Impfstämme vermitteln denselben Schutz.

## C Ergebnisse



**Abbildung C 19: Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) oder *S. typhimurium* SB824(LLO) vermittelt Schutz nach Infektion mit letaler Dosis von *L. monocytogenes* 10304s.**

Gruppen von je 8 Mäusen wurden mit dem Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) und dem Impfstamm *S. typhimurium* SB824(LLO) oral immunisiert. Als Positivkontrolle wurden Mäuse mit *L. monocytogenes* 10304s i.v. immunisiert. Als Negativkontrolle dienten naive Mäuse. 4 Wochen nach Immunisierung wurden Immunisierungsgruppen mit  $10^5$  KBE von *L. monocytogenes* infiziert und die KBE nach 72 h in der Milz bestimmt. Die Ergebnisse sind als  $\log_{10}$  Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Sterne zeigen signifikante Unterschiede ( $P \leq 0,05$ ).

## D DISKUSSION

---

Die Bildung einer langlebigen CD8 T-Zellantwort, ist für die Entwicklung neuartiger Impfstoffe essentiell, da sie Schutz gegen intrazelluläre Krankheitserreger und auch Tumore vermitteln kann. Enteropathogene Yersinien, wie *Yersinia enterocolitica* oder *Yersinia pseudotuberculosis* sind als Lebendträgerimpfstoffe vielversprechende Kandidaten (110;143;163;170). In unserem Labor wurde gezeigt, dass der Impfstamm *Yersinia enterocolitica*  $\Delta yopP$  (LLO) *in vivo* eine spezifische CD8 T-Zellantwort induzieren kann und Schutz vor einer Listerieninfektion vermittelt (163). Um einen Impfstamm zu charakterisieren, ist jedoch eine genauere Beschreibung der spezifischen CD8 T-Zellantwort erforderlich. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Impfstamm *Yersinia enterocolitica*  $\Delta yopP$  (LLO) in der Lage ist (1) langlebige Gedächtniszellen zu generieren, die (2) voll funktionsfähig sind, dabei aber (3) die Frequenz antigenspezifischer Effektorzellen („Effector T cells“,  $T_{EC}$ ), die zu Beginn der T-Zellantwort auftreten, verringert ist.

### D.1 DIE ROLLE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE IN DER CHARAKTERISIERUNG T-ZELL BASIERENDER IMPFSTOFFE

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung T-Zell basierender Impfstoffe ist, dass ihre Effektivität und Qualität nicht wie bei antikörperbasierenden Impfstoffen über den Antikörper-Titer bestimmt werden kann (156). Die Komplexität der T-Zellantwort, die aus drei Subpopulationen ( $T_{EC}$ ,  $T_{EM}$ ,  $T_{CM}$ ) mit unterschiedlichen Funktionen besteht, macht die Entwicklung neuer Modelle zur Charakterisierung notwendig. Idealerweise bestimmt man den Phänotyp und die Funktion der spezifischen T-Zellen (156), um die Wirksamkeit eines Vakzins zu testen.

Die Durchflusszytometrie wird als Standardmethode zur Charakterisierung von T-Zellen eingesetzt. Das Durchflusszytometer („Fluorescence analyzing cell sorter“, FACS) erlaubt die Charakterisierung einer einzelnen Zelle, anhand ihrer Größe, Granularität und ihrer Fluoreszenzfärbung. Dabei können durch MHC-Tetramertechnologie und Oberflächenfärbungen Aussagen über den Phänotyp, und durch Messung intrazellulärer Zytokine, der Zytotoxizität, sowie der Proliferationsfähigkeit Aussagen über die Funktionalität gemacht werden. Die MHC I-Tetramertechnologie ist eine Methode, um quantitativ antigenspezifische T-Lymphozyten über eine MHC-Antigen-Komplex *ex vivo* nachweisen zu

können (9), wobei es durch die Multiparameter-Durchflusszytometrie („*multi colour flow cytometry*“) mittlerweile möglich ist, bis zu 12 Parameter gleichzeitig zu messen (138).

Der Einsatz dieser Methoden hatte immense Bedeutung für die Charakterisierung der T-Zellantwort. Durch sie wurden die Heterogenität der CD8 T-Zellpopulationen entdeckt, funktionelle Eigenschaften aufgeklärt, sowie die T-Zellentwicklung untersucht (5;9). Eine Vielzahl kontroverser Theorien der T-Zellentwicklung werden diskutiert, die mit der Verwendung unterschiedlicher pathogener Organismen, sowie Versuchsmethoden zusammenhängen. Neben der MHC I-Tetramertechnologie werden TCR-transgene adoptive Transferstudien durchgeführt (74). Dabei hat jede Methode seine Einschränkungen: Tetramerfärbungen ermöglichen nur eine phänotypische Charakterisierung, wohingegen adoptive Transferstudien stark abhängig von der Menge der eingesetzten transgenen T-Zellen sind (74).

Laut Seder et al. wird die Qualität der T-Zellantwort durch die Quantität der T-Zellantwort, also der Frequenz antigenspezifischer T-Zellen, der Produktion von Zytokinen, der Proliferation und der zytolytischen Aktivität charakterisiert (156). In dieser Arbeit wurden phänotypische, sowie funktionelle CD8 T-Zellanalysen nach Immunisierung mit dem Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  (LLO) durchgeführt, um eine umfassende Charakterisierung der CD8 T-Zellantwort zu ermöglichen.

### D.2 DER IMPFSTAMM *YERSINIA ENTEROCOLITICA* $\Delta YOPP$ INDUZIERT EINE ANTIGENSPEZIFISCHE CD8 T-ZELLANTWORT *IN VIVO*

Der *Y. enterocolitica* Stamm, der eine Mutation im *yopP*-Gen hat, und das Fusionsprotein YopE/LLO/M45 exprimiert, ist in der Lage eine LLO-spezifische CD8 T-Zellantwort in der Maus zu induzieren. Für keine andere *Y. enterocolitica*-Mutante oder Doppelmutante, konnte eine derartige Immunantwort nachgewiesen werden (110;163;164). Das ist auf die Fähigkeit von YopP zurückzuführen, die MHC I-Präsentation in DCs zu inhibieren, Apoptose in DCs zu induzieren, und die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-8, IL-12, TNF $\alpha$  und IL-10 zu inhibieren (58;163). Auf diese Weise wird die CD8 T-Zellantwort vom WT-Stamm unterdrückt. Das 32 kb große YopP, das T3SS-abhängig

sekretiert und transloziert wird, lässt sich leicht aus dem Überstand von *Yersinia*-Kulturen isolieren und im SDS-Gel detektieren. Somit kann die *Y. enterocolitica yopP*-Mutante eindeutig identifiziert werden.

Der Impfstamm *Yersinia enterocolitica ΔyopP* kann sowohl YopE/LLO/M45, als auch YopE/p60/M45 Fusionsproteine T3SS-abhängig sekretieren und translozieren. Für die Entwicklung einer spezifischen CD8 T-Zellantwort ist die Translokation der Fusionsproteine über das T3SS in DCs essentiell. Wie die Western Blot Analyse infizierter DCs zeigt, wird das YopE/LLO/M45 Fusionsprotein in DCs transloziert, daraufhin prozessiert und über den MHC I-Weg CD8 T-Zellen präsentiert (163). Trülzsch *et al.* konnten mittels eines *in vitro* Antigenpräsentationsassays zeigen, dass eine Infektion von DCs für 1 h mit *Y. enterocolitica ΔyopP*(LLO) zu einer effektiven Antigenpräsentation und Aktivierung LLO-spezifischer CD8 T-Zellen führt, wohingegen eine längere Infektion die Aktivierung durch den Einfluss weiterer Yops verschlechtert (163).

Die Antigenpräsentation (Signal 1) ist ein entscheidender Schritt der T-Zell Aktivierung. Erfolgt diese Aktivierung nicht vollständig (Signal 1, Signal 2, Signal 3), kommt es zu keiner effektiven T-Zellantwort und die Bildung toleranter T-Zellen sind die Konsequenz (66). Inwieweit die Menge und Dauer des Antigenkontakts (MHC I:Ag/TCR) (Signal 1) die T-Zellexpansion und -entwicklung beeinflusst, wird kontrovers diskutiert (172). Für *Listeria monocytogenes* wurde durch die Unterbrechung der Infektion mit Antibiotika gezeigt, dass *in vivo* ein kurzer Antigenkontakt ausreicht, um eine programmierte antigenunabhängige T-Zellentwicklung auszulösen (16;114;118).

Da *Y. enterocolitica ΔyopP* sowohl YopE/LLO/M45 als auch YopE/p60/M45 Fusionsproteine T3SS-abhängig sekretieren kann, wurden zu Beginn der Arbeit die spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell Frequenzen mittels MHC I-Tetramertechnologie beider Antigene (LLO und p60) nach Immunisierung mit *Y. enterocolitica ΔyopP*, die das YopE/LLO/M45 oder YopE/p60/M45 translozieren, bestimmt. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der T-Zellfrequenz beider Immunisierungsgruppen. Geginat *et al.* zeigten, dass bei einer Infektion mit *L. monocytogenes* in BALB/c Mäusen LLO<sub>91-99</sub> immunogener ist als p60<sub>217-225</sub> (62). Wenn man die beiden Proteine als heterologe Antigene einsetzt, ist dieser Effekt nicht gegeben.

Ermittelt man die Frequenz der LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung mit *Y. enterocolitica ΔyopP* (LLO) anhand MHC I-Tetramertechnologie werden die Ergebnis-



se von Trülzsch *et al.* bestätigt, die mittels ELISPOT indirekt LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen über die Produktion von IFN $\gamma$  nachgewiesen haben (163). Die Charakterisierung mittels ELISPOT ist aber nicht ausreichend, um einen Impfstamm zu charakterisieren. Eine Unterscheidung zwischen den T-Zellsubpopulationen ist nicht möglich. Daher wurden detaillierte Untersuchungen vorgenommen, die mit dem Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ , der das YopE/LLO/M45 transloziert, durchgeführt wurden (163;164).

### D.3 IMMUNISIERUNG MIT *YERSINIA ENTEROCOLITICA* $\Delta YOPP$ (LLO) FÜHRT ZUR BILDUNG LANGLEBIGER GEDÄCHTNISZELLEN

Das wichtigste bei der Entwicklung eines neuen Impfstoffes ist die Bildung langlebiger Gedächtniszellen. Die phänotypische Charakterisierung der CD8 T-Zellsubpopulationen ( $T_{EC}$ ,  $T_{EM}$ ,  $T_{CM}$ ), erfolgt im murinen Modell anhand der Oberflächenmarker CD127 und CD62L (86). In Kombination mit der Tetramertechnologie und FACS-Analyse können somit spezifische CD8-Gedächtniszellen detektiert werden. Bisherige Veröffentlichungen, die die Generierung einer zytotoxischen T-Zellantwort durch den Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  (LLO) beschreiben, basieren auf Untersuchungen mittels ELISPOT, d.h. auf dem indirekten Nachweis über die IFN $\gamma$ -Produktion (163). Diese Methode erfasst allerdings nicht alle CD8 T-Zellsubpopulationen. Die zentralen Gedächtniszellen  $T_{CM}$  sind nicht in der Lage, IFN $\gamma$  zu produzieren und werden somit nicht detektiert. Damit wurde eine wichtige Population, die Langzeitschutz vermittelt, bisher nicht gemessen. Durch die Charakterisierung und Identifikation mittels Oberflächenmarker ist dies möglich.

In dieser Arbeit wurde durch MHC I-Tetramertechnologie und FACS-Analyse erstmals gezeigt, dass bei einer Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) alle Subpopulationen ( $T_{EC}$ ,  $T_{EM}$ ,  $T_{CM}$ ) LLO-spezifischer CD8 T-Zellen gebildet werden. In dem untersuchten Zeitraum von vier Wochen sind die  $T_{EM}$ -Zellen die dominierende Subpopulation, wohingegen  $T_{EC}$ - und  $T_{EM}$ -Zellen nur in geringer Frequenz vorkommen.

Für die  $T_{EM}$ -Subpopulation wurde gezeigt, dass sie bei einer Reinfektion mit *L. monocytogenes* für die protektive Immunität verantwortlich ist (87). Das wurde *in vivo* durch Generierung einer CD8 T-Zellantwort gezeigt, die ausschließlich aus  $T_{EM}$ -Zellen

besteht. Dies erreicht man durch Immunisierung mit *L. monocytogenes* und gleichzeitiger Gabe von CD40-stimulierenden Antikörper (FGK), der die CD4 T<sub>H</sub>-abhängige T<sub>EM</sub>-Antwort verstärkt. Im Gegensatz dazu werden durch eine Immunisierung mit hitzegetöteten Listerien („*heat killed Listeria*“, HKL) nur T<sub>CM</sub>-Zellen gebildet, die keinen Schutz vermitteln (87). Das zeigt, dass bei einer Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) die Hilfe durch CD4 T<sub>H</sub>-Zellen nicht beeinflusst wird, da die T<sub>EM</sub>-Subpopulation, die größte gebildete Subpopulation ist. Die Bildung von T<sub>EM</sub>-Zellen ist bei einer Immunisierung gegen Listerien demnach vollkommen ausreichend. Trotzdem ist die Generierung von T<sub>CM</sub>-Zellen für einen polyvalenten Impfstamm wichtig, da dieser gegen mehrere Erreger gleichzeitig gerichtet sein soll. So vermittelt zum Beispiel bei einer Infektion mit *Vaccinia* oder dem Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) die T<sub>CM</sub>-Subpopulation Schutz (14).

Vergleicht man die Verteilung der Subpopulationen nach Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) mit der durch Immunisierung mit dem Standardorganismus *L. monocytogenes* generierten LLO-spezifischen CD8 T-Zellantwort, kann man erkennen, dass im letzteren Fall eine deutlich höhere Frequenz an T<sub>EC</sub>-Zellen und eine geringere Frequenz an T<sub>EM</sub>-Zellen gebildet wird.

Die Ausbildung von Effektorfunktionen wird durch die Art der Aktivierung, sowie durch das Zytokinmilieu, aber auch co-stimulatorischen Faktoren beeinflusst. Vergleicht man *Y. enterocolitica* mit *L. monocytogenes* zeigen sich grundsätzliche Unterschiede in der Pathogenese und Art der Immunantwort. Dabei muss beachtet werden, dass sich die beiden Stämme schon in der Art der Applikation im murinen Modell unterscheiden. *L. monocytogenes* muss im Gegensatz zu *Y. enterocolitica* intravenös verabreicht werden, da Listerien im murinen Modell oral nicht pathogen wirken. Die Invasion von *Listeria* wird im Menschen durch das Oberflächenmolekül E-Cadherin vermittelt. Dieses unterscheidet sich in der Maus aber in einer AS, so dass die Invasion nicht mehr möglich ist (109).

Die Listerien gelangen nach intravenöser Injektion innerhalb weniger Minuten in die Milz, dem Ort der T-Zellaktivierung (45). Hier persistieren sie überwiegend in Makrophagen und wandern innerhalb von 24 h in die T-Zellzone der weißen Pulpa, wobei es gleichzeitig zur Apoptose von T-Zellen kommt (119). Gleichzeitig kommt es zu einer starken inflammatorischen Immunantwort, d.h. zur Produktion von TNF $\alpha$  und IL-12

durch Makrophagen und in der Folge zur Produktion von IFN $\gamma$  durch NK-Zellen. Diese angeborene Immunantwort ist für die Bekämpfung einer primären Listerieninfektion verantwortlich (176). In Folge dessen kommt es zur Bildung von CTLs, die für die Eliminierung der Listerien nötig sind. Die Aktivierung der CD8 T-Zellen erfolgt über Kreuzpräsentation durch Makrophagen, da DCs nicht von Listerien infiziert werden (129).

*L. monocytogenes* ist der Standardorganismus der Immunologie mit welchem die angeborene und adaptive Immunantwort detailliert charakterisiert wurde. Im Gegensatz dazu ist die durch *Y. enterocolitica* induzierte Immunantwort, vor allem im oralen Modell, wesentlich schlechter charakterisiert.

Durch die orale Immunisierung mit *Yersinia* gelangen die Bakterien erst nach 24 h in die Milz infizierter Mäuse (70;164). Bei einer Infektion mit *Yersinia* kommt es zur Inhibition der pro-inflammatorischen Immunantwort. Studien mit dem WT-Stamm *Y. enterocolitica* zeigten, dass erhöhte Werte an TNF $\alpha$  an Tag 1 und von IFN $\gamma$  erst an Tag 3 festzustellen waren. IL-2 konnte an keinem Tag detektiert werden (70). IL-2 spielt eine Rolle in der Generierung proliferationsfähiger T-Gedächtniszellen.

Das pro-inflammatorische Milieu spielt bei der Generierung von Effektorfunktionen eine wesentliche Rolle. Wie man sehen kann, ist dieses bei einer Infektion mit *Yersinia* stark beeinflusst, was natürlich Einfluss auf die T-Zellentwicklung hat.

#### D.4 DURCH *Y. ENTEROCOLITICA* $\Delta$ YOPP (LLO) INDUZIERTER PHASEN DER T-ZELLANTWORT UND QUANTITATIVE ANALYSE

Um eine qualitative Aussage über eine spezifische T-Zellantwort machen zu können, ist zusätzlich die quantitative Bestimmung der LLO-spezifischen CD8 T-Zellen erforderlich. Dazu wurden in dieser Arbeit die Anzahl der LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels MHC-Tetramertechnologie aus der Milz, sowie der Lunge und den Lymphknoten zu verschiedenen Zeitpunkten detektiert und die Kinetik der T-Zellantwort bestimmt. In der Literatur wird die T-Zellantwort in 4 Phasen unterteilt: (i) die Aktivierung, (ii) die Expansion, (iii) die Kontraktionsphase, sowie die (iv) Gedächtnisphase (74).

Die durch *Y. enterocolitica*  $\Delta$ yopP (LLO) induzierte LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort, setzt sieben Tage nach Immunisierung ein, erreicht bis Woche 3 nach Immunisierung das Maximum und geht dann in die Kontraktionsphase über. Vergleicht man die Kinetik in der Milz und den Lymphknoten, mit der in der Lunge induzierten LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort, wird deutlich, dass in Milz und Lymphknoten (i) eine geringere Anzahl LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen gebildet wird und (ii) keine eindeutige Expansion stattfindet. Wie sich durch die gleichzeitige Untersuchung der Verteilung der LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Subpopulationen zeigt, korreliert die geringe Expansion mit der niedrigen Frequenz der T<sub>EC</sub>-Subpopulation in Milz und Lymphknoten.

Bei viralen (LCMV) und bakteriellen (*L. monocytogenes*) Infektionen wurde eine schnelle und hohe antigenspezifische T-Zellantwort nachgewiesen, die an Tag 7 oder 8 ihr Maximum erreicht (35;37;124). Für *L. monocytogenes* wurde gezeigt, dass 2 Tage nach der höchsten Bakterienbelastung in der Milz, das Maximum der T-Zellantwort erreicht wird, das mit der Eliminierung des Pathogens korreliert (34). Des Weiteren wurde für *Listeria* und LCMV gezeigt, dass die Expansion und Kontraktion unabhängig von der Persistenz des Antigens ist, also während der Aktivierung eine programmierte Zelldifferenzierung initiiert wird (16). Diese Daten basieren auf intravenösen Untersuchungen. Durch die orale Gabe von *Y. enterocolitica* kommt es zu einer verzögerten Besiedlung der Milz, die zu einer verzögerten CD8 T-Zellantwort führt. Bei einer Infektion mit *Y. enterocolitica*  $\Delta$ yopP (LLO) wird an Tag 7 nach Immunisierung die maximale Bakteriendosis in der Milz erreicht, und bis zum Tag 12 können keine Bakterien mehr isoliert werden (164). D.h., dass auch bei der *Yersinia*-Infektion das Maximum der spezifischen

CD8 T-Zellantwort erst nach Eliminierung der Bakterien erreicht wird. Dies entspricht Veröffentlichungen, dass die T-Zellentwicklung einem programmierten Ablauf folgt (16;98;114;118).

Die Generierung von langlebigen Gedächtniszellen benötigt jedoch die Persistenz von Antigen (171). Von Bachmann *et al.* wurde durch Untersuchungen mit akuten und chronischen Infektionen gezeigt, dass die Verteilung der CD8 T-Zellsubpopulationen bzw. die Bildung von Gedächtniszellen von der Persistenz des Antigens abhängig ist (14). Dabei werden über eine intermediäre T-Zellpopulation zuerst CD127-/CD62L<sup>+</sup> Zellen (T<sub>EM</sub>) gebildet, die sich ohne Antigenkontakt zu T<sub>CM</sub>- und mit Antigenkontakt zu T<sub>EC</sub>-Zellen entwickeln. Die Entwicklung zu einer stabilen Verteilung von T<sub>EC</sub>, sowie T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> ist Folge einer niedrig dosierten dauerhaften Antigenpräsenz (chronische Infektion). Eine kurze starke Antigenpräsenz (akute Infektion) führt dagegen zu einer Entwicklung von T<sub>EC</sub>-Zellen zu überwiegend T<sub>CM</sub>-Zellen, eine langanhaltende starke Antigenpräsenz führt zu einer langhaltig bestehenden T<sub>EC</sub>-Subpopulation (14).

Diese Ergebnisse können durch *Yersinia*-Studien bestätigt werden. Wie oben bereits beschrieben erreicht die Anzahl an T<sub>EC</sub>-Zellen nach Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta$ *yopP*(LLO) zu keinem Zeitpunkt nach Immunisierung mehr als 60 % der gesamten LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation, wohingegen T<sub>EM</sub>-Zellen zum Teil zu 90 % vorliegen und zu allen Zeitpunkten die dominante Zellpopulation darstellt. Die progressive Differenzierung der LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist also auch bei einer *Yersinia*-Infektion zu beobachten.

Für die Entwicklung eines präventiven oralen Lebendträgerimpfstoffes ist es nicht von Bedeutung, ob Effektorzellen gebildet werden, da T<sub>EM</sub>- und T<sub>CM</sub>-Zellen Langzeitschutz gewährleisten. Impfstoffe können neben ihrem präventiven Einsatz aber auch therapeutisch eingesetzt werden. Die Frage bleibt offen, ob die geringe Anzahl an Effektorzellen für eine therapeutische Behandlung ausreichend ist.

## D.5 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-ZELLEN

Um die Qualität der durch den Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) gebildeten LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu bestimmen, müssen neben den phänotypischen Merkmalen die funktionellen Eigenschaften charakterisiert werden.

*Protektive Potenzial:* In dieser Arbeit wurden die KBE von *L. monocytogenes* nach Reinfektion immunisierter Tiere bestimmt, und so das protektive Potential des Impfstammes nachgewiesen. Durch eine Belastungsinfektion in immunisierten Tieren wurde gezeigt, dass die LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen T-Zellen bei einer letalen Dosis (20 x LD<sub>50</sub>) partiellen Schutz gegenüber *L. monocytogenes* vermitteln (> 4 log<sub>10</sub>). Harty & Bevan konnten zeigen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die nur für LLO spezifisch sind, die KBE bei einer Listerien-Infektion um > 3 log<sub>10</sub> verringern (75).

Bei Belastungsinfektionen ist zu beachten, dass die Ergebnisse stark von der gewählten Infektionsdosis, dem gewählten *L. monocytogenes*-Stamm und den Mausstämmen abhängig sind, und daher starken Schwankungen unterliegen (36). In früheren Immunisierungsstudien mit oralen Lebendvektoren und dem heterologen Fusionsprotein YopE/LLO wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt: Durch Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) in BALB/c Mäusen wurde bei einer Belastungsinfektion mit dem Stamm *L. monocytogenes* sv1/2aEGD kompletter Schutz erreicht (110). Dasselbe Experiment in CB6F1-Mäusen führte zu partiellem Schutz (163). In dieser Arbeit wurde mit dem virulenteren Stamm *L. monocytogenes* 10403s gearbeitet und eine höhere Infektionsdosis verwendet, so dass der partielle Schutz als positiv zu bewerten ist.

Der durch subletale Immunisierung mit *L. monocytogenes* 10304s erzielte Komplettschutz wird durch eine vollständig ausgelöste adaptive Immunantwort erzielt, die zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses führt und vor einer *Listeria*-Reinfektion schützt. Neben den LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8 T-Zellen werden auch andere Antigene MHC H2-K<sup>d</sup>-abhängig präsentiert (p60<sub>217-225</sub>; p60<sub>449-357</sub>; mpl<sub>84-92</sub>) und führen zu Bildung spezifischer T-Zellen (36). Neben den CTLs übernehmen aber auch CD4 T<sub>H</sub>-Zellen (p60<sub>367-368</sub>) und H2-M3-abhängige T-Zellen durch Epitope der Antigene LemA und der Leader Peptidase Schutzfunktionen in der listerienabhängigen Immunantwort (36;176). Frühere Veröffentlichungen zeigen, dass die Immunisierung mit einem *Salmonella* Impfstamm, der gleichzeitig YopE/LLO und YopE/p60 transloziert, zu einem verstärkten Schutz gegenüber einer Listeriose führt (89).

*Produktion von IFN $\gamma$* : Ein anderer wesentlicher Faktor, durch den spezifische CD8 T-Zellen beurteilt werden, ist die Produktion von IFN $\gamma$ . IFN $\gamma$  bewirkt die Chemotaxis von Leukozyten und Makrophagen, und führt zu Wachstum, Reifung und Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen, wie Natürlichen Killerzellen und B-Zellen (155). IFN $\gamma$  wird von CTLs, Th1-Lymphozyten, NK-Zellen, sowie B-Zellen, NKT-Zellen und APCs produziert und wirkt selbst-aktivierend, sowie aktivierend auf umliegende Zellen (155).

Für CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen wurde entsprechend ihrem Phänotyp die Produktion verschiedener Zytokine gezeigt (86). Eine IFN $\gamma$ -Produktion konnte für T<sub>EC</sub>- und T<sub>EM</sub>-Zellen nachgewiesen werden. Andere Studien zeigen aber auch die Produktion von IFN $\gamma$  durch T<sub>CM</sub>-Zellen (14). Die Fähigkeit, IFN $\gamma$  zu bilden ist abhängig von der Zeitspanne seit dem letzten Antigenkontakt. Je kürzer diese ist, umso besser reagieren die Zellen auf erneute Antigenstimulierung (14).

Die in dieser Arbeit detektierten IFN $\gamma$ -produzierenden CD8 T-Zellen waren alle CD62L<sup>-</sup>, d.h. sie entsprachen T<sub>EC</sub>- oder T<sub>EM</sub>-Zellen. Parallel wurde eine Tetramerfärbung durchgeführt, die die gleiche Frequenz an LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergab.

*Zytotoxizität*: Weiteren Aufschluss über die Funktionalität der LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergab die Untersuchung der lytischen Aktivität durch einen *in vivo* Zytotoxizitätsassay. Die Lysekapazität (64 %) der durch Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) generierten LLO-spezifischen CD8 T-Zellen zeigt, dass zytolytische Funktionen innerhalb von 24 h erreicht werden können.

Die T<sub>EC</sub>-Subpopulation besitzt direkte Zytotoxizität, da hier Perforin und Granzym in Granula gelagert wird und somit direkte zytolytische Aktivität möglich ist (14). Für T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> wurden dagegen geringere zytolytische Aktivität gezeigt.

*Antigenabhängige Proliferation*: Neben oben genannten funktionellen Eigenschaften stellt die Proliferationsfähigkeit der einzelnen Subpopulationen ein wichtiges Merkmal dar. Zentrale Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub>) besitzen die Fähigkeit zur antigenabhängigen Proliferation, wohingegen T<sub>EM</sub>-Zellen nur schwache proliferative Eigenschaften zeigen und die T<sub>EC</sub>-Subpopulation nicht in der Lage ist, nach Antigenkontakt zu proliferieren (88). Andere Studien zeigen jedoch, dass alle Subpopulationen in der Lage sind, nach Antigenkontakt zu proliferieren (14)

Durch *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) generierte LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigen die gleiche *in vivo* Proliferationsfähigkeit wie die durch *L. monocytogenes* generierten spezifischen

CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Betrachtet man sich die Verteilung der Subpopulationen, der schon proliferierten Zellen, ist die größte Population T<sub>CM</sub> gefolgt von T<sub>EC</sub> und T<sub>EM</sub>. Die T<sub>CM</sub>-Subpopulation zeigt eindeutige proliferative Charakteristika. T<sub>EM</sub>-Zellen sind die kleinste Population. Das lässt sich dadurch erklären, dass die proliferierten Zellen bereits Effektorfunktionen erhalten haben und zu Effektorzellen differenziert sind. Huster *et al.* zeigten, dass sich T<sub>EM</sub>-Zellen zu T<sub>EC</sub>-Zellen entwickeln können (87).

### D.6 EINFLUSS DER YOPS AUF DIE IMMUNANTWORT

Betrachtet man die Immunantwort nach einer Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) kann man verschiedene Effekte beobachten: Die Expansionsstärke in der Milz und den Lymphknoten und die Frequenz der T<sub>EC</sub>-Subpopulation ist gering. In der Lunge ist das nicht der Fall, hier kommt es zu einer starken Expansion. In allen Organen wurde zu jedem Zeitpunkte eine auffällig große Menge an T<sub>EM</sub>-Zellen nachgewiesen. Die auftretende T<sub>CM</sub>-Population, sowie die funktionellen Eigenschaften der LLO<sup>+</sup> CD8 T-Zellsubpopulationen, zeigen keine Auffälligkeiten.

Verschiedene Einflüsse auf die CD8 T-Zellentwicklung wurden bereits in vorherigen Abschnitten diskutiert. Wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung der CD8 T-Zellen haben aber auch die noch vorhandenen Yops von *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ . Die Yops (YopH, YopO, YopP, YopE, YopM und YopT) werden im lymphatischen Gewebe benötigt, um die wirtseigene Immunantwort zu umgehen und die Proliferation der Bakterien im extrazellulären Bereich zu ermöglichen.

Wie bereits oben erwähnt, konnten Trülzsch *et al.* mittels Antigenpräsentationsassays zeigen, dass eine Infektion von DCs für 1 h mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) zu einer effektiven Antigenpräsentation und Aktivierung LLO-spezifischer CD8 T-Zellen führt, wohingegen eine längere Infektion die Aktivierung durch den Einfluss weiterer Yops verschlechtert (163). Studien mit  $\Delta yopP$  Doppelmutanten, konnten jedoch keine Verbesserung der CD8 T-Zellantwort zeigen (110). Diese Stämme sind derart attenuiert, dass keine adaptive Immunantwort gebildet wird, da die Bakterien vom angeborenen Immunsystem eliminiert werden.

*In vivo*-Studien zeigen, dass *Y. enterocolitica* Yops über das T3SS in DCs, Makrophagen und Granulozyten transloziert, wohingegen CD4 und CD8 T-Zellen keine Zielzellen sind



(113). Das heißt, dass demnach die geringe T-Zellfrequenz und die fehlenden Effektorzellen nicht die Folge direkter Lyse oder Zerstörung sind.

Vielmehr ist anzunehmen, dass die T-Zellantwort durch den Einfluss der Yops auf DCs und Makrophagen das proinflammatorische Milieu (Signal 3) verändern. DCs und Makrophagen produzieren nach Interaktionen von TLRs Typ I-Interferone und IL-12 und bilden so ein bestimmtes proinflammatorisches Milieu (72;74). Fehlt dieses proinflammatorische Signal, kommt es während der Expansionsphase zu einer verminderten Fähigkeit der Effektorzellen zu überleben und die Zellen werden apoptotisch (51;52;74). Die Abwesenheit von proinflammatorischen Signalen beeinflusst aber auch die Kontraktionsphase und in Folge kommt es zu einer vergrößerten Gedächtniszellpopulation (17;74). Ein weiteres wichtiges Zytokin, das starken Einfluss auf die T-Zellentwicklung hat, ist IL-12 (13).

Es wurde für YopP, YopH und YopE gezeigt, dass sie das proinflammatorische Milieu beeinflussen (48;167). Den stärksten Einfluss auf die T-Zellentwicklung wurde von YopH gezeigt. YopH blockiert den Phosphatidylinositol 3-Kinase Weg (PI3K), dadurch wird die IL-2 Produktion inhibiert und somit die T-Zellaktivierung und Proliferation unterdrückt (150). Durch die Inhibierung von PI3K wird außerdem die Wanderung von Makrophagen in Lymphknoten unterdrückt (128). YopH ist zusätzlich in der Lage, den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B zu blockieren (141). NF $\kappa$ B wird über TLRs und TCRs aktiviert und reguliert die Produktion von TNF $\alpha$ , IL-2, IL-6 und IL-8 (18). Auch dadurch wird die T-Zellentwicklung beeinflusst.

Das Effektorprotein YopE inaktiviert als GAP („*GTPase activating protein*“) die GTPasen RhoA, Cdc42 und besonders Rac-1 (10;132). Durch die Deaktivierung von Rac-1 wird die autoproteolytische Aktivierung von Caspase-1 inhibiert, wodurch die Reifung von proIL-1 $\beta$  gehemmt wird. ProIL-1 $\beta$  spielt für die Regulation der Immunantwort eine entscheidende Rolle (154).

Diese Studien zeigen, dass die Yops starken Einfluss auf regulatorische Mechanismen und die Ausbildung des proinflammatorischen Milieu haben. Auf diese Weise wird die T-zellantwort, die durch *Y. enterocolitica*  $\Delta$ yopP induziert wird, beeinflusst.

## D.7 DIE IMPFSTÄMME *YERSINIA* UND *SALMONELLA* IM VERGLEICH

Neben dem Impfstamm *Yersinia enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) wurde in unserer Arbeitsgruppe auch für den oralen Impfstamm *Salmonella typhimurium* SB824(LLO) gezeigt, dass er eine spezifische T-Zellantwort hervorrufen kann (144). Wie auch bei *Yersinia* basiert der *Salmonella*-Impfstoff auf dem Prinzip, dass heterologe Antigene über das T3SS transloziert und MHC I-abhängig präsentiert werden (145).

*Yersinia* und *Salmonella* gehören zu der Familie der *Enterobacteriaceae* und sind enteropathogene Erreger, die lebensmittelbedingte gastrointestinale Infektionen hervorrufen (84). Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Stämmen besteht in ihrer extra- und intrazellulären Lebensweise. Während *Y. enterocolitica*, wie schon in der Einleitung beschrieben, extrazellulär in lymphoidem Gewebe persistiert (71), hat *S. typhimurium* eine intrazelluläre Lebensweise.

*S. typhimurium* führt in der Maus zu einer systemischen Infektion. Die Bakterien dringen über die M-Zellen oder Enterozyten des terminalen Ileums ein, gelangen in die Lymphfollikel der Peyerschen Plaques und dringen von hier in die mesenterialen Lymphknoten, Milz und Leber vor (43). *Salmonella* ist in der Lage, in nicht-phagozytierende Zellen einzudringen und der Internalisierung durch Phagozyten zu entkommen. Dabei persistieren die Bakterien intrazellulär in einem membrangebundenen Kompartiment, einer sogenannten *Salmonella-containing vacuole* (SCV), auch Makropinosom genannt (1). Von hier aus werden die Effektorproteine, wie auch das Fusionsprotein YopE/LLO/M45 durch ein T3SS in das Zytosol der Wirtszelle transloziert (1;142;144).

*Kolonisierung:* Diese intrazelluläre Lebensweise von *S. typhimurium* ist für die Entwicklung eines *Salmonella*-Impfstoffes ein deutlicher Nachteil gegenüber dem *Yersinia*-Impfstoff. Die Salmonellen lassen sich schlechter durch das Immunsystems des Körpers eliminieren und stellen somit eine größere Belastung dar. Bisherige Untersuchungen zeigen, dass *S. typhimurium* SB824 bis zu Tag 21 aus der Milz von BALB/c-Mäusen isoliert werden konnten (unveröffentlichte Daten), wohingegen *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  nur bis Tag 7 in der Milz zu finden war (164).

Um die beiden Impfstämme direkt in CB6F1-Mäusen zu vergleichen und diese These zu überprüfen, wurde zuerst eine Kolonisierungsstudie mit beiden Impfstämmen durchgeführt. Es konnte im CB6F1-Mausmodell gezeigt werden, dass *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$

(LLO) die Milz und Leber schneller besiedelt, aber auch früher eliminiert wurde als *S. typhimurium* SB824 (LLO). Bei oraler Gabe kommt es zu einer schnelleren und kürzeren, aber auch stärkeren Besiedlung der Milz durch *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  (LLO), wohingegen *S. typhimurium* SB824 (LLO) später in die Milz gelangt, länger persistiert und in geringerer Anzahl vorkommt.

Wie bereits diskutiert, hat die Dauer der Besiedlung Einfluss auf die Entwicklung spezifischer T-Zellen (s. D.4). Um diesen Einfluss zu überprüfen, wurden die Kinetik der LLO-spezifischen T-Zellen und die Verteilung der Subpopulationen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

*Zytotoxische T-Zellantwort:* Entsprechend der verzögerten Besiedlung der Milz durch *S. typhimurium* SB824(LLO) sind in der ersten Woche nach Immunisierung keine LLO-spezifischen CD8 T-Zellen nachweisbar. Dagegen setzt bei Immunisierung mit dem Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) die LLO-spezifische CD8 T-Zellantwort schon in der ersten Woche nach Immunisierung ein. Dies ist ein wichtiger Faktor beim Einsatz der Impfstoffe als therapeutische Vakzine. Hier soll der Impfstoff schnell wirken, um den Krankheitserreger oder Tumor zu eliminieren.

Wie wirkt sich nun die unterschiedliche Besiedlung auf die Verteilung der CD8 T-Zellsubpopulationen ( $T_{EC}$ ,  $T_{EM}$ ,  $T_{CM}$ ) aus? Von Bachmann *et al.* wurde gezeigt, dass eine schwache, dauerhaft anhaltende Infektion, zur stabilen Verteilung von  $T_{EC}$ , sowie  $T_{EM}$  und  $T_{CM}$  führt, wohingegen eine kurze starke Antigenpräsenz zur Entwicklung von  $T_{EC}$  Zellen zu überwiegend  $T_{CM}$ -Zellen führt (14).

In unseren Modellen kommt es durch Immunisierung mit *S. typhimurium* SB824(LLO) in der vierten Woche nach Immunisierung zu einer gleichmäßigen Verteilung der drei Subpopulationen. Diese Verteilung entspricht den Verhältnissen, wie sie für eine chronische Infektion nachgewiesen wurden (14). Für die Immunisierung mit *Yersinia* wurde in der vierten Woche nach Immunisierung auch alle Subpopulationen nachgewiesen, jedoch lagen die  $T_{EM}$ -Zellen in der Mehrzahl vor.

*Protektive Potenzial:* Die Auswirkungen der unterschiedlichen Verteilung auf das protektive Potenzial der beiden Impfstämme wurden in einem Schutzexperiment überprüft. Wie bereits oben erwähnt, wurde für eine Infektion mit *L. monocytogenes* die  $T_{EM}$ -Subpopulation als schutzvermittelnde Population beschrieben (87). Bei einer Reinfektion mit *L. monocytogenes* konnte jedoch gezeigt werden, dass das gleiche protektive Potenzial vorlag. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Immunisierungsgrup-

pen vor. Die gebildeten LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben also unabhängig von ihrer Verteilung, dasselbe protektive Potenzial. Wie oben bereits beschrieben, liegt der durch *Listeria*-Immunisierung generierte Komplettschutz an der durch verschiedene Listerien-Antigenen generierten Immunantwort.

Zusammenfassend kann man sagen, dass *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  der vielversprechendere Impfstoffkandidat ist. Der Impfstamm führt zu einer früheren spezifischen CD8 T-Zellantwort und wird schneller aus Milz und Leber entfernt.

## E ZUSAMMENFASSUNG

Der Impfstamm *Yersinia enterocolitica* 0:8 mit einer Mutation im *yopP*-Gen kann als oraler Lebendträgerimpfstoff verwendet werden, um Schutz gegen intrazelluläre Bakterien zu vermitteln. Extrazelluläre Yersinien können über ihr Typ III Sekretionssystem (T3SS) heterologe Antigene in das Zytosol antigenpräsentierender Zellen translozieren. Das führt zur MHC Klasse I-abhängiger Antigenpräsentation und einer zellulären Immunantwort, die aus spezifischen CD8 T-Zellen besteht.

Der Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  transloziert das YopE/LLO/M45 Fusionsprotein, das aus einem 138 Aminosäure langen Teil des Transportproteins YopE und einem Proteinfragment des Listeriolysins (LLO) von *Listeria monocytogenes* besteht. Die Immunisierung von CB6F1-Mäusen mit diesem Impfstamm führt zur Bildung LLO<sub>91-99</sub>-spezifischer CD8 T-Zellen, die Schutz vor einer Reinfektion mit dem Wildtypstamm von *L. monocytogenes* vermitteln.

Um die Effektivität und Qualität T-Zell-basierender Impfstoffe zu bewerten, ist die exakte Charakterisierung der komplexen T-Zellantwort erforderlich. Mittels MHC Klasse I-Tetramertechnologie wurde die Kinetik der LLO<sub>91-99</sub>-spezifischen CD8 T-Zellantwort zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und gezeigt, dass die LLO<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort in der ersten Woche nach Immunisierung einsetzt und bis Woche 3 ihr Maximum erreicht.

Zusätzlich wurde das Vorkommen LLO<sub>91-99</sub>-spezifischer CD8 T-Zellsubpopulationen (T<sub>EC</sub>, T<sub>EM</sub>, T<sub>CM</sub>) in Milz, Lunge und Lymphknoten überprüft. Die Unterscheidung zwischen den drei Subpopulationen ist anhand der Oberflächenmarker CD127/CD62L möglich. Die Bildung langlebiger Gedächtniszellen ist Grundvoraussetzung bei der Entwicklung von T-Zell-basierenden Impfstoffen. Es konnte gezeigt werden, dass beide Subpopulationen von Gedächtniszellen gebildet werden, die T<sub>EM</sub>-Subpopulation nach einer Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) aber die dominierende Subpopulation darstellt.

Neben dieser phänotypischen Charakterisierung, ist die funktionelle Beschreibung der zytotoxischen T-Zellen unerlässlich. Die durch *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ (LLO) gebildeten LLO-spezifischen CD8 T-Zellen sind in der Lage IFN $\gamma$  zu produzieren, zeigen *in vivo* zytotoxische Aktivität und haben volle antigenabhängige Proliferationsfähigkeit. Die Produk-

tion von  $\text{IFN}\gamma$  bewirkt das Anlocken von Leukozyten und Makrophagen, und führt zu Wachstum, Reifung und Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen, wie Natürlichen Killerzellen und B-Zellen. Die zytotoxische Aktivität zeigt, dass die CTLs in der Lage sind, durch Perforin und Granzym die infizierten Zellen zu lysieren, bzw. Apoptose zu induzieren. Der Nachweis antigenabhängiger Proliferation gewährleistet die Funktionsfähigkeit der Gedächtniszellen.

Der Vergleich des *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ -Impfstammes mit dem *S. typhimurium* SB824 Impfstamm zeigte, dass – bei gleichem protektiven Potenzial – die systemische Infektion schneller von dem Immunsystem unter Kontrolle gebracht wird. Zusätzlich kommt es bei Immunisierung mit *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  zu einer früheren Immunantwort als bei *S. typhimurium* SB824.

Der Impfstamm *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$  ist ein außerordentlich vielversprechender Kandidat zur Entwicklung eines T-Zell-basierenden oralen Lebendträgerimpfstoffes. Er ist in der Lage, eine voll funktionsfähige spezifische T-Zellantwort zu induzieren, die sowohl Effektor- als auch Gedächtniszellen beinhaltet. Seine rasche Eliminierung aus dem Körper, sowie seine frühe Immunantwort machen ihn zu einem attraktiven Impfstoffkandidaten.

Die exakte Charakterisierung der spezifischen T-Zellantwort ermöglicht eine effektive Weiterentwicklung des oralen Lebendträgerimpfstoffes *Y. enterocolitica*  $\Delta yopP$ .

## F LITERATURVERZEICHNIS

1. Abrahams,G.L.; Hensel,M. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cell Microbiol.* 2006, 8, 728-737.
2. Ada,G. Overview of vaccines and vaccination. *Mol.Biotechnol.* 2005, 29, 255-272.
3. Adkins,I.; Koberle,M.; Grobner,S.; Bohn,E.; Autenrieth,I.B.; Borgmann,S. Yersinia outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. *Int.J.Med.Microbiol.* 2007, 297, 235-244.
4. Aepfelbacher,M.; Trasak,C.; Ruckdeschel,K. Effector functions of pathogenic Yersinia species. *Thromb.Haemost.* 2007, 98, 521-529.
5. Ahmed,R.; Gray,D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996, 272, 54-60.
6. Akira,S.; Uematsu,S.; Takeuchi,O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, 124, 783-801.
7. Alarcon,B.; Gil,D.; Delgado,P.; Schamel,W.W. Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. *Immunol.Rev.* 2003, 191, 38-46.
8. Aldovini,A.; Young,R.A. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* 1991, 351, 479-482.
9. Altman,J.D.; Moss,P.A.; Goulder,P.J.; Barouch,D.H.; McHeyzer-Williams,M.G.; Bell,J.I.; McMichael,A.J.; Davis,M.M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996, 274, 94-96.
10. Andor,A.; Trulzsch,K.; Essler,M.; Roggenkamp,A.; Wiedemann,A.; Heesemann,J.; Aepfelbacher,M. YopE of Yersinia, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol.* 2001, 3, 301-310.
11. Autenrieth,I.B.; Vogel,U.; Preger,S.; Heymer,B.; Heesemann,J. Experimental Yersinia enterocolitica infection in euthymic and T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. *Infect.Immun.* 1993, 61, 2585-2595.
12. Aylward,B.; Hennessey,K.A.; Zagaria,N.; Olive,J.M.; Cochi,S. When is a disease eradicable? 100 years of lessons learned. *Am.J.Public Health* 2000, 90, 1515-1520.
13. Bachmann,M.F.; Oxenius,A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep.* 2007, 8, 1142-1148.

14. Bachmann,M.F.; Wolint,P.; Schwarz,K.; Jager,P.; Oxenius,A. Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J.Immunol.* 2005, *175*, 4686-4696.
15. Badovinac,V.P.; Harty,J.T. Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. *Immunol.Rev.* 2006, *211*, 67-80.
16. Badovinac,V.P.; Porter,B.B.; Harty,J.T. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat.Immunol.* 2002, *3*, 619-626.
17. Badovinac,V.P.; Tvinnereim,A.R.; Harty,J.T. Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* 2000, *290*, 1354-1358.
18. Baldwin,A.S., Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* 1996, *14*, 649-683.
19. Bannard,O.; Kraman,M.; Fearon,D.T. Secondary replicative function of CD8+ T cells that had developed an effector phenotype. *Science* 2009, *323*, 505-509.
20. Belkaid,Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat.Rev.Immunol.* 2007, *7*, 875-888.
21. Bennett,S.R.; Carbone,F.R.; Karamalis,F.; Flavell,R.A.; Miller,J.F.; Heath,W.R. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 1998, *393*, 478-480.
22. Bevan,M.J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J.Exp.Med.* 1976, *143*, 1283-1288.
23. Bevan,M.J. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J.Immunol.* 1976, *117*, 2233-2238.
24. Bevan,M.J. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat.Rev.Immunol.* 2004, *4*, 595-602.
25. Beverley,P.C.; Daser,A.; Michie,C.A.; Wallace,D.L. Functional subsets of T cells defined by isoforms of CD45. *Biochem.Soc.Trans.* 1992, *20*, 184-187.
26. Bishop,D.K.; Hinrichs,D.J. Adoptive transfer of immunity to *Listeria monocytogenes*. The influence of in vitro stimulation on lymphocyte subset requirements. *J.Immunol.* 1987, *139*, 2005-2009.
27. Black,D.S.; Bliska,J.B. The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol.Microbiol.* 2000, *37*, 515-527.
28. Blander,J.M. Phagocytosis and antigen presentation: a partnership initiated by Toll-like receptors. *Ann.Rheum.Dis.* 2008, *67 Suppl 3*, iii44-iii49.



29. Blander, J.M.; Medzhitov, R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 2006, *440*, 808-812.
30. Boland, A.; Cornelis, G.R. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during Yersinia infection. *Infect.Immun.* 1998, *66*, 1878-1884.
31. Bousso, P. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nat.Rev.Immunol.* 2008.
32. Bromley, S.K.; Thomas, S.Y.; Luster, A.D. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat.Immunol.* 2005, *6*, 895-901.
33. Bryant, P.; Ploegh, H. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr.Opin.Immunol.* 2004, *16*, 96-102.
34. Busch, D.H.; Pamer, E.G. T lymphocyte dynamics during *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol.Lett.* 1999, *65*, 93-98.
35. Busch, D.H.; Pilip, I.; Pamer, E.G. Evolution of a complex T cell receptor repertoire during primary and recall bacterial infection. *J.Exp.Med.* 1998, *188*, 61-70.
36. Busch, D.H.; Vijn, S.; Pamer, E.G. Animal model for infection with *Listeria monocytogenes*. *Curr.Protoc.Immunol.* 2001, *Chapter 19*, Unit.
37. Butz, E.A.; Bevan, M.J. Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity.* 1998, *8*, 167-175.
38. Carter, P.B. Animal model of human disease. Yersinia enteritis. Animal model: oral Yersinia enterocolitica infection of mice. *Am.J.Pathol.* 1975, *81*, 703-706.
39. Caux, C.; Ait-Yahia, S.; Chemin, K.; de Bouteiller, O.; Dieu-Nosjean, M.C.; Homey, B.; Massacrier, C.; Vanbervliet, B.; Zlotnik, A.; Vicari, A. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin.Immunopathol.* 2000, *22*, 345-369.
40. Chamillard, M.; Hashimoto, M.; Horie, Y.; Masumoto, J.; Qiu, S.; Saab, L.; Ogura, Y.; Kawasaki, A.; Fukase, K.; Kusumoto, S.; Valvano, M.A.; Foster, S.J.; Mak, T.W.; Nunez, G.; Inohara, N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat.Immunol.* 2003, *4*, 702-707.
41. Chang, J.T.; Palanivel, V.R.; Kinjyo, I.; Schambach, F.; Intlekofer, A.M.; Banerjee, A.; Longworth, S.A.; Vinup, K.E.; Mrass, P.; Oliaro, J.; Killeen, N.; Orange, J.S.; Russell, S.M.; Weninger, W.; Reiner, S.L. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 2007, *315*, 1687-1691.
42. Chavez-Galan, L.; Arenas-Del Angel, M.C.; Zenteno, E.; Chavez, R.; Lascurain, R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol.Immunol.* 2009, *6*, 15-25.

43. Clark,M.A.; Jepson,M.A.; Simmons,N.L.; Hirst,B.H. Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res.Microbiol.* 1994, *145*, 543-552.
44. Clark,W.R.; Walsh,C.M.; Glass,A.A.; Huang,M.T.; Ahmed,R.; Matloubian,M. Cell-mediated cytotoxicity in perforin-less mice. *Int.Rev.Immunol.* 1995, *13*, 1-14.
45. Conlan,J.W. Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen. *J.Med.Microbiol.* 1996, *44*, 295-302.
46. Constantin,C.M.; Bonney,E.E.; Altman,J.D.; Strickland,O.L. Major histocompatibility complex (MHC) tetramer technology: an evaluation. *Biol.Res.Nurs.* 2002, *4*, 115-127.
47. Cooper,M.D.; Alder,M.N. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 2006, *124*, 815-822.
48. Cornelis,G.R. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2002, *3*, 742-752.
49. Cornelis,G.R.; Boland,A.; Boyd,A.P.; Geuijen,C.; Iriarte,M.; Neyt,C.; Sory,M.P.; Stainier,I. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 1998, *62*, 1315-1352.
50. Cossart,P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes.Infect.* 2007, *9*, 1143-1146.
51. Curtsinger,J.M.; Gerner,M.Y.; Lins,D.C.; Mescher,M.F. Signal 3 availability limits the CD8 T cell response to a solid tumor. *J.Immunol.* 2007, *178*, 6752-6760.
52. Curtsinger,J.M.; Valenzuela,J.O.; Agarwal,P.; Lins,D.; Mescher,M.F. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J.Immunol.* 2005, *174*, 4465-4469.
53. Dietrich,G.; Viret,J.F.; Hess,J. Novel vaccination strategies based on recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Int.J.Med.Microbiol.* 2003, *292*, 441-451.
54. Drabner,B.; Guzman,C.A. Elicitation of predictable immune responses by using live bacterial vectors. *Biomol.Eng* 2001, *17*, 75-82.
55. Dustin,M.L. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol.Rev.* 2008, *221*, 77-89.
56. Dustin,M.L.; Tseng,S.Y.; Varma,R.; Campi,G. T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr.Opin.Immunol.* 2006, *18*, 512-516.
57. el Tahir,Y.; Skurnik,M. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. *Int.J.Med.Microbiol.* 2001, *291*, 209-218.
58. Erfurth,S.E.; Grobner,S.; Kramer,U.; Gunst,D.S.; Soldanova,I.; Schaller,M.; Aute-nrieth,I.B.; Borgmann,S. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits

- surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect.Immun.* 2004, 72, 7045-7054.
59. Fajardo-Moser,M.; Berzel,S.; Moll,H. Mechanisms of dendritic cell-based vaccination against infection. *Int.J.Med.Microbiol.* 2008, 298, 11-20.
  60. Gaillard,J.L.; Berche,P.; Frehel,C.; Gouin,E.; Cossart,P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 1991, 65, 1127-1141.
  61. Galan,J.E.; Wolf-Watz,H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 2006, 444, 567-573.
  62. Geginat,G.; Schenk,S.; Skoberne,M.; Goebel,W.; Hof,H. A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*. *J.Immunol.* 2001, 166, 1877-1884.
  63. GELL,P.G.; BENACERRAF,B. Studies on hypersensitivity. II. Delayed hypersensitivity to denatured proteins in guinea pigs. *Immunology* 1959, 2, 64-70.
  64. Gentschev,I.; Dietrich,G.; Spreng,S.; Pilgrim,S.; Stritzker,J.; Kolb-Maurer,A.; Goebel,W. Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. *Int.J.Med.Microbiol.* 2002, 291, 577-582.
  65. Gerlach,R.G.; Hensel,M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int.J.Med.Microbiol.* 2007, 297, 401-415.
  66. Gett,A.V.; Sallusto,F.; Lanzavecchia,A.; Geginat,J. T cell fitness determined by signal strength. *Nat.Immunol.* 2003, 4, 355-360.
  67. Goldrath,A.W.; Sivakumar,P.V.; Glaccum,M.; Kennedy,M.K.; Bevan,M.J.; Benoist,C.; Mathis,D.; Butz,E.A. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J.Exp.Med.* 2002, 195, 1515-1522.
  68. Grutzkau,A.; Hanski,C.; Hahn,H.; Riecken,E.O. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 1990, 31, 1011-1015.
  69. Hamon,M.; Bierne,H.; Cossart,P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat.Rev.Microbiol.* 2006, 4, 423-434.
  70. Handley,S.A.; Dube,P.H.; Revell,P.A.; Miller,V.L. Characterization of oral *Yersinia enterocolitica* infection in three different strains of inbred mice. *Infect.Immun.* 2004, 72, 1645-1656.
  71. Hanski,C.; Naumann,M.; Hahn,H.; Riecken,E.O. Determinants of invasion and survival of *Yersinia enterocolitica* in intestinal tissue. An in vivo study. *Med.Microbiol.Immunol.* 1989, 178, 289-296.
  72. Haring,J.S.; Badovinac,V.P.; Harty,J.T. Inflaming the CD8+ T cell response. *Immunity.* 2006, 25, 19-29.

73. Hartung, M. Epidemiologisches Bulletin, Ausgewählte Zoonosen im Jahr 2005: Durch Lebensmittel übertragbare bakterielle gastrointestinale Infektionen. Käsbohrer, A., Alter, T., and Wichmann-Schauer, H. Eds. Nr.41. 2006. Robert-Koch-Institut.
74. Harty, J.T.; Badovinac, V.P. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat.Rev.Immunol.* 2008, 8, 107-119.
75. Harty, J.T.; Bevan, M.J. CD8+ T cells specific for a single nonamer epitope of *Listeria monocytogenes* are protective in vivo. *J.Exp.Med.* 1992, 175, 1531-1538.
76. Hayashi, F.; Smith, K.D.; Ozinsky, A.; Hawn, T.R.; Yi, E.C.; Goodlett, D.R.; Eng, J.K.; Akira, S.; Underhill, D.M.; Aderem, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001, 410, 1099-1103.
77. Heesemann, J.; Gross, U.; Schmidt, N.; Laufs, R. Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect.Immun.* 1986, 54, 561-567.
78. Heesemann, J.; Laufs, R. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J.Bacteriol.* 1983, 155, 761-767.
79. Heesemann, J.; Sing, A.; Trulzsch, K. *Yersinia*'s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr.Opin.Microbiol.* 2006, 9, 55-61.
80. Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H.; Matsumoto, M.; Hoshino, K.; Wagner, H.; Takeda, K.; Akira, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000, 408, 740-745.
81. Henderson, R.H. World Health Organization Expanded Programme on Immunization: progress and evaluation report. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1989, 569, 45-68.
82. Hoiseth, S.K.; Stocker, B.A. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 1981, 291, 238-239.
83. Homann, D.; Teyton, L.; Oldstone, M.B. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat.Med.* 2001, 7, 913-919.
84. Hueck, C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 1998, 62, 379-433.
85. Huppa, J.B.; Davis, M.M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat.Rev.Immunol.* 2003, 3, 973-983.
86. Huster, K.M.; Busch, V.; Schiemann, M.; Linkemann, K.; Kerksiek, K.M.; Wagner, H.; Busch, D.H. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004, 101, 5610-5615.

87. Huster,K.M.; Koffler,M.; Stemberger,C.; Schiemann,M.; Wagner,H.; Busch,D.H. Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells. *Eur.J.Immunol.* 2006, *36*, 1453-1464.
88. Huster,K.M.; Stemberger,C.; Busch,D.H. Protective immunity towards intracellular pathogens. *Curr.Opin.Immunol.* 2006, *18*, 458-464.
89. Igwe,E.I.; Geginat,G.; Russmann,H. Concomitant cytosolic delivery of two immunodominant listerial antigens by Salmonella enterica serovar typhimurium confers superior protection against murine listeriosis. *Infect.Immun.* 2002, *70*, 7114-7119.
90. Isberg,R.R.; Hamburger,Z.; Dersch,P. Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes.Infect.* 2000, *2*, 793-801.
91. Janssen,E.M.; Lemmens,E.E.; Wolfe,T.; Christen,U.; von Herrath,M.G.; Schoenberger,S.P. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 2003, *421*, 852-856.
92. Jensen,P.E. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat.Immunol.* 2007, *8*, 1041-1048.
93. Joosten,S.A.; Ottenhoff,T.H. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Hum.Immunol.* 2008, *69*, 760-770.
94. Joosten,S.A.; van Meijgaarden,K.E.; Savage,N.D.; de Boer,T.; Triebel,F.; van der,W.A.; de Heer,E.; Klein,M.R.; Geluk,A.; Ottenhoff,T.H. Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007, *104*, 8029-8034.
95. Judge,A.D.; Zhang,X.; Fujii,H.; Surh,C.D.; Sprent,J. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J.Exp.Med.* 2002, *196*, 935-946.
96. Kaech,S.M.; Ahmed,R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat.Immunol.* 2001, *2*, 415-422.
97. Kaech,S.M.; Hemby,S.; Kersh,E.; Ahmed,R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 2002, *111*, 837-851.
98. Kaech,S.M.; Wherry,E.J.; Ahmed,R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat.Rev.Immunol.* 2002, *2*, 251-262.
99. Kalia,V.; Sarkar,S.; Gourley,T.S.; Rouse,B.T.; Ahmed,R. Differentiation of memory B and T cells. *Curr.Opin.Immunol.* 2006, *18*, 255-264.
100. Kaufmann,S.H. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat.Rev.Microbiol.* 2007, *5*, 491-504.
101. Kim-Farley,R. Global immunization. The Expanded Programme on Immunization Team. *Annu.Rev.Public Health* 1992, *13*, 223-237.

102. Kocks,C.; Gouin,E.; Tabouret,M.; Berche,P.; Ohayon,H.; Cossart,P. L. monocyto- genes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 1992, *68*, 521-531.
103. Krieg,A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *An- nu.Rev.Immunol.* 2002, *20*, 709-760.
104. Kuhle,V.; Hensel,M. Cellular microbiology of intracellular Salmonella enterica: functions of the type III secretion system encoded by Salmonella pathogenicity island 2. *Cell Mol.Life Sci.* 2004, *61*, 2812-2826.
105. Kumagai,Y.; Takeuchi,O.; Akira,S. Pathogen recognition by innate receptors. *J.Infect.Chemother.* 2008, *14*, 86-92.
106. Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, *227*, 680-685.
107. Lanzavecchia,A.; Sallusto,F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat.Rev.Immunol.* 2002, *2*, 982-987.
108. Lauvau,G.; Vijn,S.; Kong,P.; Horng,T.; Kerksiek,K.; Serbina,N.; Tuma,R.A.; Pa- mer,E.G. Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vac- cine. *Science* 2001, *294*, 1735-1739.
109. Lecuit,M.; Vandormael-Pournin,S.; Lefort,J.; Huerre,M.; Gounon,P.; Dupuy,C.; Ba- binet,C.; Cossart,P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 2001, *292*, 1722-1725.
110. Leibiger,R.; Niedung,K.; Geginat,G.; Heesemann,J.; Trulzsch,K. Yersinia enterocoli- tica Yop mutants as oral live carrier vaccines. *Vaccine* 2008.
111. Levine,M.M. Can needle-free administration of vaccines become the norm in global immunization? *Nat.Med.* 2003, *9*, 99-103.
112. Lutz,M.B.; Kukutsch,N.; Ogilvie,A.L.; Rossner,S.; Koch,F.; Romani,N.; Schuler,G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J.Immunol.Methods* 1999, *223*, 77-92.
113. Marketon,M.M.; DePaolo,R.W.; DeBord,K.L.; Jabri,B.; Schneewind,O. Plague bacte- ria target immune cells during infection. *Science* 2005, *309*, 1739-1741.
114. Masopust,D.; Kaech,S.M.; Wherry,E.J.; Ahmed,R. The role of programming in memory T-cell development. *Curr.Opin.Immunol.* 2004, *16*, 217-225.
115. Masopust,D.; Vezys,V.; Marzo,A.L.; Lefrancois,L. Preferential localization of effec- tor memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2001, *291*, 2413-2417.
116. McKenna,K.; Beignon,A.S.; Bhardwaj,N. Plasmacytoid dendritic cells: linking in- nate and adaptive immunity. *J.Virol.* 2005, *79*, 17-27.
117. Medina,E.; Guzman,C.A. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* 2001, *19*, 1573-1580.

118. Mercado,R.; Vijn,S.; Allen,S.E.; Kerksiek,K.; Pilip,I.M.; Pamer,E.G. Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J.Immunol.* 2000, *165*, 6833-6839.
119. Merrick,J.C.; Edelson,B.T.; Bhardwaj,V.; Swanson,P.E.; Unanue,E.R. Lymphocyte apoptosis during early phase of Listeria infection in mice. *Am.J.Pathol.* 1997, *151*, 785-792.
120. Mescher,M.F.; Curtsinger,J.M.; Agarwal,P.; Casey,K.A.; Gerner,M.; Hammerbeck,C.D.; Popescu,F.; Xiao,Z. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol.Rev.* 2006, *211*, 81-92.
121. Mills,S.D.; Boland,A.; Sory,M.P.; van der,S.P.; Kerbourn,C.; Finlay,B.B.; Cornelis,G.R. Yersinia enterocolitica induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997, *94*, 12638-12643.
122. Monack,D.M.; Meccas,J.; Bouley,D.; Falkow,S. Yersinia-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. *J.Exp.Med.* 1998, *188*, 2127-2137.
123. Monack,D.M.; Meccas,J.; Ghori,N.; Falkow,S. Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997, *94*, 10385-10390.
124. Murali-Krishna,K.; Altman,J.D.; Suresh,M.; Sourdive,D.J.; Zajac,A.J.; Miller,J.D.; Slansky,J.; Ahmed,R. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity.* 1998, *8*, 177-187.
125. Norcross,M.A. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann.Immunol.(Paris)* 1984, *135D*, 113-134.
126. Obert,S.; O'Connor,R.J.; Schmid,S.; Hearing,P. The adenovirus E4-6/7 protein transactivates the E2 promoter by inducing dimerization of a heteromeric E2F complex. *Mol.Cell Biol.* 1994, *14*, 1333-1346.
127. Ostroff,S.M.; Kapperud,G.; Lassen,J.; Aasen,S.; Tauxe,R.V. Clinical features of sporadic Yersinia enterocolitica infections in Norway. *J.Infect.Dis.* 1992, *166*, 812-817.
128. Palframan,R.T.; Jung,S.; Cheng,G.; Weninger,W.; Luo,Y.; Dorf,M.; Littman,D.R.; Rollins,B.J.; Zweerink,H.; Rot,A.; von Andrian,U.H. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J.Exp.Med.* 2001, *194*, 1361-1373.
129. Pamer,E.G. Immune responses to Listeria monocytogenes. *Nat.Rev.Immunol.* 2004, *4*, 812-823.
130. Pamer,E.G.; Harty,J.T.; Bevan,M.J. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of Listeria monocytogenes. *Nature* 1991, *353*, 852-855.

131. Paul,W.E.; Mizuguchi,J.; Brown,M.; Nakanishi,K.; Hornbeck,P.; Rabin,E.; Ohara,J. Regulation of B-lymphocyte activation, proliferation, and immunoglobulin secretion. *Cell Immunol.* 1986, 99, 7-13.
132. Pawel-Rammingen,U.; Telepnev,M.V.; Schmidt,G.; Aktories,K.; Wolf-Watz,H.; Rosqvist,R. GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure. *Mol.Microbiol.* 2000, 36, 737-748.
133. Pearce,E.L.; Shen,H. Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J.Immunol.* 2007, 179, 2074-2081.
134. Poltorak,A.; He,X.; Smirnova,I.; Liu,M.Y.; Van Huffel,C.; Du,X.; Birdwell,D.; Alejos,E.; Silva,M.; Galanos,C.; Freudenberg,M.; Ricciardi-Castagnoli,P.; Layton,B.; Beutler,B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998, 282, 2085-2088.
135. Prlic,M.; Lefrancois,L.; Jameson,S.C. Multiple choices: regulation of memory CD8 T cell generation and homeostasis by interleukin (IL)-7 and IL-15. *J.Exp.Med.* 2002, 195, F49-F52.
136. Pulendran,B.; Ahmed,R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006, 124, 849-863.
137. Robinson,H.L.; Amara,R.R. T cell vaccines for microbial infections. *Nat.Med.* 2005, 11, S25-S32.
138. Roederer,M.; Brenchley,J.M.; Betts,M.R.; De Rosa,S.C. Flow cytometric analysis of vaccine responses: how many colors are enough? *Clin.Immunol.* 2004, 110, 199-205.
139. Rosqvist,R.; Forsberg,A.; Rimpilainen,M.; Bergman,T.; Wolf-Watz,H. The cytotoxic protein YopE of Yersinia obstructs the primary host defence. *Mol.Microbiol.* 1990, 4, 657-667.
140. Rosqvist,R.; Forsberg,A.; Wolf-Watz,H. Intracellular targeting of the Yersinia YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect.Immun.* 1991, 59, 4562-4569.
141. Ruckdeschel,K.; Harb,S.; Roggenkamp,A.; Hornef,M.; Zumbihl,R.; Kohler,S.; Heesemann,J.; Rouot,B. Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J.Exp.Med.* 1998, 187, 1069-1079.
142. Russmann,H. Inverted pathogenicity: the use of pathogen-specific molecular mechanisms for prevention or therapy of disease. *Int.J.Med.Microbiol.* 2004, 293, 565-569.
143. Russmann,H.; Gerdemann,U.; Igwe,E.I.; Panthel,K.; Heesemann,J.; Garbom,S.; Wolf-Watz,H.; Geginat,G. Attenuated Yersinia pseudotuberculosis carrier vaccine



- for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction. *Infect.Immun.* 2003, 71, 3463-3472.
144. Russmann,H.; Igwe,E.I.; Sauer,J.; Hardt,W.D.; Bubert,A.; Geginat,G. Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant Salmonella expressing hybrid Yersinia type III proteins. *J.Immunol.* 2001, 167, 357-365.
  145. Russmann,H.; Shams,H.; Poblete,F.; Fu,Y.; Galan,J.E.; Donis,R.O. Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. *Science* 1998, 281, 565-568.
  146. Russmann,H.; Weissmuller,A.; Geginat,G.; Igwe,E.I.; Roggenkamp,A.; Bubert,A.; Goebel,W.; Hof,H.; Heesemann,J. Yersinia enterocolitica-mediated translocation of defined fusion proteins to the cytosol of mammalian cells results in peptide-specific MHC class I-restricted antigen presentation. *Eur.J.Immunol.* 2000, 30, 1375-1384.
  147. Sabine Reiter; Gernot Rasch Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 1, Schutzimpfungen. *Robert Koch Institut, Statistisches Bundesamt* 2004.
  148. Salerno-Goncalves,R.; Szein,M.B. Cell-mediated immunity and the challenges for vaccine development. *Trends Microbiol.* 2006, 14, 536-542.
  149. Sallusto,F.; Lenig,D.; Forster,R.; Lipp,M.; Lanzavecchia,A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999, 401, 708-712.
  150. Sauvonnet,N.; Lambermont,I.; van der,B.P.; Cornelis,G.R. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol.Microbiol.* 2002, 45, 805-815.
  151. Schmid,D.; Munz,C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity.* 2007, 27, 11-21.
  152. Schodel,F.; Curtiss,R., III Salmonellae as oral vaccine carriers. *Dev.Biol.Stand.* 1995, 84, 245-253.
  153. Schott,M. Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. *Endocr.Relat Cancer* 2006, 13, 779-795.
  154. Schotte,P.; Denecker,G.; Van Den,B.A.; Vandenabeele,P.; Cornelis,G.R.; Beyaert,R. Targeting Rac1 by the Yersinia effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1beta. *J.Biol.Chem.* 2004, 279, 25134-25142.
  155. Schroder,K.; Hertzog,P.J.; Ravasi,T.; Hume,D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J.Leukoc.Biol.* 2004, 75, 163-189.
  156. Seder,R.A.; Darrah,P.A.; Roederer,M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat.Rev.Immunol.* 2008, 8, 247-258.

157. Shimazu,R.; Akashi,S.; Ogata,H.; Nagai,Y.; Fukudome,K.; Miyake,K.; Kimoto,M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.* 1999, *189*, 1777-1782.
158. Shortman,K.; Liu,Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat.Rev.Immunol.* 2002, *2*, 151-161.
159. Stemberger,C.; Huster,K.M.; Koffler,M.; Anderl,F.; Schiemann,M.; Wagner,H.; Busch,D.H. A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity.* 2007, *27*, 985-997.
160. Sun,J.C.; Bevan,M.J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 2003, *300*, 339-342.
161. Tang,Q.; Bluestone,J.A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat.Immunol.* 2008, *9*, 239-244.
162. Towbin,H.; Staehelin,T.; Gordon,J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1979, *76*, 4350-4354.
163. Trulzsch,K.; Geginat,G.; Sporleder,T.; Ruckdeschel,K.; Hoffmann,R.; Heesemann,J.; Russmann,H. Yersinia outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *J Immunol.* 2005, *174*, 4244-4251.
164. Trulzsch,K.; Sporleder,T.; Igwe,E.I.; Russmann,H.; Heesemann,J. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect.Immun.* 2004, *72*, 5227-5234.
165. Trulzsch,K.; Sporleder,T.; Leibiger,R.; Russmann,H.; Heesemann,J. Yersinia as oral live carrier vaccine: influence of Yersinia outer proteins (Yops) on the T-cell response. *Int.J.Med.Microbiol.* 2008, *298*, 59-67.
166. Unanue,E.R. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol.Rev.* 1997, *158*, 11-25.
167. Viboud,G.I.; So,S.S.; Ryndak,M.B.; Bliska,J.B. Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol.Microbiol.* 2003, *47*, 1305-1315.
168. Vyas,J.M.; Van der Veen,A.G.; Ploegh,H.L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat.Rev.Immunol.* 2008, *8*, 607-618.
169. Wherry,E.J.; Teichgraber,V.; Becker,T.C.; Masopust,D.; Kaech,S.M.; Antia,R.; von Andrian,U.H.; Ahmed,R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat.Immunol.* 2003, *4*, 225-234.
170. Wiedig,C.A.; Kramer,U.; Garbom,S.; Wolf-Watz,H.; Autenrieth,I.B. Induction of CD8+ T cell responses by Yersinia vaccine carrier strains. *Vaccine* 2005, *23*, 4984-4998.

171. Williams,M.A.; Bevan,M.J. Shortening the infectious period does not alter expansion of CD8 T cells but diminishes their capacity to differentiate into memory cells. *J.Immunol.* 2004, *173*, 6694-6702.
172. Williams,M.A.; Bevan,M.J. Effector and memory CTL differentiation. *Annu.Rev.Immunol.* 2007, *25*, 171-192.
173. Williams,M.A.; Holmes,B.J.; Sun,J.C.; Bevan,M.J. Developing and maintaining protective CD8+ memory T cells. *Immunol.Rev.* 2006, *211*, 146-153.
174. Williams,M.A.; Tyznik,A.J.; Bevan,M.J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 2006, *441*, 890-893.
175. Xie,Z.; Klionsky,D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat.Cell Biol.* 2007, *9*, 1102-1109.
176. Zenewicz,L.A.; Shen,H. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes.Infect.* 2007, *9*, 1208-1215.

## MEIN BESONDERER DANK GILT

Herrn Prof. Dr. Holger Rüssmann für die Bereitstellung des Themas, das Interesse an meiner Arbeit, sowie die Betreuung und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit am Max von Pettenkofer-Institut in München.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Adelbert Roscher und PD Dr. Florian Schödel für die Erstellung der Zweitgutachten.

Herrn Prof. Dr. Dirk Busch vom Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie der TUM für die Bereitstellung der Tetramere.

Dr. Klaus Panthel, Gudrun Pfaffinger, Stefan Jellbauer und Justin Hetrodt für die gemeinsame Zeit im Labor.

Krischtl, Isabella, Tina, Kathrin, Rike, Nadia, Steffi, Iris, Andrea, Gigi, Julia, Susi und allen anderen für die gegenseitige Unterstützung und die lustige Zeit.

Ich danke ganz besonders meinen Eltern und meiner Schwester für die jahrelange Unterstützung und für alles was Sie für mich getan haben.

Manuel, vielen Dank für die seelische Unterstützung und alles andere.