

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

Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

**Charakterisierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellsubpopulationen nach
oralen Immunisierung mit rekombinanten
Salmonella typhimurium-Impfstämmen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katrin Meinel

aus

Kempten

Jahr

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Rüssmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. T. Löscher
PD Dr. P. Kufer

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

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2007

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

Ort, Datum

Katrin Meinel

I Inhaltsverzeichnis	1
II Abkürzungen	4
1 Einleitung	7
1.1 Vakzine.....	7
1.2 Das Immunsystem.....	8
1.2.1 Angeborene und erworbene Immunität.....	8
1.2.2 Antigenpräsentation.....	10
1.2.3 T-Zellaktivierung.....	11
1.2.3.1 CD4 ⁺ T-Zellen.....	11
1.2.3.2 CD8 ⁺ T-Zellen.....	12
1.2.4 Das immunologische Gedächtnis.....	13
1.2.5 Charakterisierung der T-Gedächtniszellen mittels Oberflächenmarker.....	14
1.2.5.1 Humane Marker.....	14
1.2.5.2 Murine Marker.....	15
1.2.6 Homeostase der T-Gedächtniszellen.....	17
1.2.7 Die Rolle der CD4 ⁺ -Hilfe bei der CD8 ⁺ -Antwort.....	18
1.3 Salmonellen.....	19
1.3.1 Salmonellen als Krankheitserreger.....	19
1.3.2 Pathogenese von <i>S. typhimurium</i> in Mäusen.....	20
1.3.3 Typ III-Sekretionssysteme von <i>S. typhimurium</i>	20
1.3.4 Salmonellen als Lebendvektor.....	25
1.3.5 Induktion von CD8 ⁺ T-Zellantworten mit <i>S. typhimurium</i> in der Maus.....	26
1.4 <i>Listeria monocytogenes</i> als Infektionsmodell.....	28
Zielsetzung	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Geräte.....	31
2.2 Chemikalien und Biochemikalien.....	31
2.3 Transfermembranen.....	32
2.4 Verbrauchsmaterialien.....	32
2.5 Peptide.....	33
2.6 Antikörper.....	33
2.7 Bakterien und Plasmide.....	34

2.7.1 Bakterienstämme	34
2.7.2 Plasmide	34
2.8 Mausstamm	34
2.9 Pufferlösungen und Medien	35
2.9.1 Puffer und Gele für SDS-PAGE.....	36
2.9.2 Puffer für Lungenpräparation.....	37
2.10 Molekularbiologische Methoden.....	38
2.10.1 Anzucht von <i>S. typhimurium</i>	38
2.10.2 Präparation der Expressionsproteine von <i>S. typhimurium</i>	38
2.10.3 Nachweis der Translokation von p60-Fusionsproteinen.....	39
2.10.4 SDS-PAGE.....	39
2.10.5 Immunoblot	40
2.11 Immunologische Methoden.....	41
2.11.1 Orale Immunisierung mit <i>S. typhimurium</i>	41
2.11.2 Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	42
2.11.3 Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut	42
2.11.4 Organentnahme	42
2.11.4.1 Verarbeitung von Milz und Lymphknoten.....	43
2.11.4.2 Verarbeitung der Lunge	43
2.11.5 Zellzahlbestimmung	43
2.11.6 ELISPOT-Assay.....	44
2.11.7 Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern	44
2.11.7.1 Tetramerfärbung.....	44
2.11.7.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung	45
2.11.7.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	45
2.11.8 BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine)-Färbung	46
2.11.9 <i>Listeria</i> -Koloniebestimmung nach Belastungsinfektion.....	46
2.11.10 <i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest	47
3 Ergebnisse.....	48
3.1 Herstellung von <i>Salmonella</i> SPI1- und SPI2-Hybridproteinen.....	48
3.2 <i>Salmonella</i> -T3SS-abhängige Sekretion von p60-Fusionsproteinen.....	49
3.3 Nachweis der Translokation von p60-Fusionsproteinen.....	50
3.4 Nachweis IFN- γ -sekretierender antigenspezifischer T-Zellen mittels ELISPOT-Assay.....	51

3.5 Schutz vor einer <i>L. monocytogenes</i> -Infektion nach oraler Immunisierung mit 52	52
SB824(pHR261) und SB824(pHR281)..... 52	52
3.6 Rolle der CD8 ⁺ T-Zellen beim Schutz vor einer <i>L. monocytogenes</i> -Infektion nach oraler Immunisierung 54	54
3.7 Nachweis antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen mittels Tetramer-Technologie 55	55
3.8 Funktionalität der p60-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen 59	59
3.8.1 Antigen-spezifische Zytokinproduktion 59	59
3.8.2 Effektorfunktion der CTLs..... 60	60
3.9 Generierung von antigenspezifischen CD8 ⁺ -Gedächtniszellen nach einer oralen 62	62
Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen 62	62
3.10 Lokalisation der CD8 ⁺ T-Zellsubpopulationen 64	64
3.11 Proliferation der T _{ZM} -Population 68	68
3.12 Bestimmung der funktionellen Avidität..... 71	71
4 Diskussion 73	73
4.1 Generierung p60 ₂₁₇₋₂₂₅ -spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen nach oraler Immunisierung mit.... 73	73
<i>S. typhimurium</i> 73	73
4.2 Effektorfunktion der generierten antigenspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen 77	77
4.3 Charakterisierung der induzierten CD8 ⁺ T-Zellsubpopulationen 79	79
4.4 Funktionelle Analyse der CD8 ⁺ T-Zellsubpopulationen..... 82	82
5 Zusammenfassung 85	85
6 Literaturverzeichnis 88	88
Danksagung98	98

II Abkürzungen

Abb.	Abbildungen
Ab	Antikörper (<i>antibody</i>)
AEC	Amino-Ethyl-Carbazol
Amp	Ampicillin
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>) oder Allophycocyanin
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BrdU	Bromodeoxyuridine
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagle medium</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC ₅₀	effektive Konzentration um bei 50 % der Zellen eine Wirkung zu erzielen
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	Ethidiumbromid Monoazid
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
h	Stunde
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
IgG	Immunoglobulin G

IL	Interleukin
i.p., i.v.	intraperitoneal, intravenös
IFN	Interferon
KBE	kolonie-bildende Einheit
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
LD ₅₀	letale Dosis für 50 % der Individuen
<i>Listeria</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Lk	Lymphknoten
Lsg.	Lösung
M	Mol pro Liter
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minute
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
M/V	Masse pro Volumen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonyl- Fluorid
PP	Peyersche Plaques
rpm	<i>revolution per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle

T _E	Effektor T-Zellen
T _{EM}	Effektor Gedächtnis T-Zellen (<i>effector memory T cells</i>)
T _{ZM}	Zentrale Gedächtnis T-Zellen (<i>central memory T cells</i>)
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
T _H	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
V/V	Volumen pro Volumen
WHO	<i>world health organisation</i>
W/V	Masse pro Volumen
W/W	Masse pro Masse

1 Einleitung

1.1 Vakzine

Infektionen gehören zu den häufigsten Todesursachen beim Menschen. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden weltweit etwa 30% aller Todesfälle durch Infektionskrankheiten verursacht. Eine wichtige präventive Maßnahme zur Bekämpfung von Infektionen ist der Einsatz von Impfstoffen.

Edward Jenner führte 1796 die ersten Impfungen durch. Er konnte zeigen, dass Menschen, die mit dem virulenzabgeschwächten Kuhpockenvirus infiziert wurden, vor einer letalen Pockeninfektion durch das Variolavirus geschützt waren. Seit 1979 gilt die Pockeninfektion nach WHO-Richtlinien als ausgerottet.

Der routinemäßige Einsatz von Vakzinen gegen bakterielle und virale Infektionen hat die Morbidität und Mortalität weltweit reduziert. Zu den bekämpften Krankheiten gehören unter anderem Diphtherie, Masern, Mumps, Polio, Röteln und Tetanus. Diese erfolgreichen Vakzinierungen zeigen deutlich, dass das humane Immunsystem in der Lage ist, eine Immunantwort gegen Infektionen zu generieren und ein Leben lang aufrechtzuerhalten (Hilleman, 2000). Das Ziel einer Vakzine ist, diesen lebenslangen Schutz herbeizuführen. Die meisten Impfstoffentwicklungen zielten darauf ab, eine humorale Immunantwort zu aktivieren, um langlebige Plasmazellen hervorzubringen. Diese Zellen produzieren spezifische Antikörper, die Toxine neutralisieren oder die Ausbreitung des Mikroorganismus verhindern können. Durch sogenannte Totimpfstoffe (abgetötete Bakterien, Proteine, Toxoide) können hohe Antikörpertiter induziert werden, die einen langen Schutz vor Erkrankungen, wie beispielsweise Hepatitis A und B, geben können. Gegen viele pathogene Erreger, wie z.B. intrazelluläre Bakterien und Viren ist jedoch eine ausschließlich humorale Immunantwort nicht hilfreich, sondern es muss zur Stimulierung einer zellulären Immunantwort kommen. Das heißt, ein Impfstoff gegen Krankheiten wie Tuberkulose, Malaria und AIDS muss spezifische T-Zellantworten (zytotoxische und T-Helfer-Lymphozyten) hervorbringen. Der Erfolg von Vakzinen, die eine zelluläre Immunität induzieren, wird durch $CD8^+$ T-Zellen und $CD4^+$ T-Zellen vermittelt. $CD8^+$ T-Zellen können den Verlauf der Infektion limitieren, indem sie infizierte Zellen erkennen und eliminieren sowie antivirale Zytokine ausschütten (Robinson und Amara, 2005). $CD4^+$ T-Zellen liefern Wachstumsfaktoren und Signale für die Generierung (Bourgeois *et al.*, 2002) und Aufrechterhaltung von $CD8^+$ T-Zellen (Sun und Bevan, 2003). Die Aktivierung dieser zellulären Immunität, neben der humoralen Antwort, kann durch Lebendimpfstoffe erreicht werden. Hierbei handelt es sich um lebende, virulenzabgeschwächte (attenuierte)

Mikroorganismen, die Schutz gegen die Wildtypinfektion (homologe Vakzine) induzieren oder als sog. Lebendvektoren eingesetzt werden, um immundominante Epitope anderer Erreger (heterologe Vakzine) zu exprimieren. Die Art der Impfverabreichung spielt dabei ebenfalls eine wichtige Rolle. Ein Großteil der Vakzine wird intramuskulär gegeben, was jedoch ausschließlich zu einer systemischen Immunantwort führt (Michalek *et al.*, 1995).

Die meisten Krankheitserreger nutzen die mukosalen Oberflächen wie Respirations- und Gastrointestinaltrakt als Eintrittspforte in den Körper. Die orale Verabreichung von Impfstoffen stellt daher eine attraktive Möglichkeit dar, um zusätzlich zur systemischen Antwort bereits an der Eintrittspforte die lokale (mukosale) Immunantwort zu aktivieren (Everest *et al.*, 1995; Heesemann *et al.*, 1993; Levine und Dougan, 1998). Durch eine orale Immunisierung kann somit eine Kolonisierung und Invasion eines pathogenen Mikroorganismus verhindert werden. Des Weiteren sind orale Vakzine leicht zu handhaben, was gerade in Entwicklungsländern von Bedeutung ist, da durch Verwendung von Kanülen und Spritzen bei Massenimpfungen oft Krankheiten übertragen werden.

1.2 Das Immunsystem

1.2.1 Angeborene und erworbene Immunität

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor eindringenden Krankheitserregern und Tumoren zu schützen. Dies wird durch die Interaktion zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem ermöglicht. Substanzen, die als körperfremd erkannt werden, aktivieren die Wirkungsmechanismen des Immunsystems, wie die Antigenpräsentation, die T-Zellinduktion und die T-Zell-Gedächtnisentwicklung. Viele dieser Mechanismen sind bekannt, einige jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Das angeborene Immunsystem dient der sofortigen, ersten Abwehr und nutzt hierfür Neutrophile Zellen, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Weitere Komponenten des angeborenen Immunsystems sind das Komplementsystem und die Zytokine. Nachdem ein Mikroorganismus die natürlichen Barrieren des Organismus (z.B. Epithelschranke, Lysozym) erfolgreich überwunden hat, ist die angeborene Immunität innerhalb von Stunden in der Lage, unspezifisch zu antworten. Die Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen alle verschiedene Rezeptoren und erkennen Mikroorganismen anhand ihrer pathogenassoziierten molekularen Muster, sog. PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (Abbas, 2000). Diese Strukturen kommen z.B. in der mikrobiellen Membran, Zellwänden, Proteinen und DNA vor. Sie werden u.a. durch die

konservierten Toll-ähnlichen Rezeptoren erkannt (*toll-like receptors*, TLRs). Die Aktivierung der Zellen steuert die Sekretion von Zytokinen. Diese wiederum liefern Signale für die Produktion weiterer Entzündungsmediatoren, welche schließlich zur Rekrutierung weiterer Effektorzellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems führen.

Die adaptive Immunantwort basiert auf Lymphozyten mit antigenspezifischen Rezeptoren, die körperfremde Substanzen erkennen und deren Eliminierung induzieren können. Man unterscheidet dabei die B- und die T-Lymphozyten. Die Rezeptormoleküle der B-Zellen (*B cell receptor*, BCR) sind membrangebundene Antikörper, die sog. Immunglobuline (Ig), die ein Antigen spezifisch erkennen können. Die Aktivierung von B-Zellen führt zur Differenzierung und Proliferation der Zellen in der B-Zellregion der sekundären Lymphorgane und endet mit einer Antikörper-sezernierenden Plasmazelle (Slifka und Ahmed, 1998). Die löslichen Antikörper (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE) können spezifisch an Antigene binden und bewirken so eine Neutralisierung bakterieller Toxine, eine Opsonierung von Mikroorganismen oder auch die Aktivierung des Komplementsystems, welches zur Antikörper-vermittelten Eliminierung des Krankheitserregers führt. Die Rezeptormoleküle der T-Zellen (*T cell receptor*, TCR) hingegen binden ein Antigen nur im Komplex mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC). Trifft die naive T-Zelle auf diesen Antigen/MHC-Komplex und kann spezifisch daran binden, benötigt sie zusätzliche stimulierende Signale, um aktiviert zu werden, so dass es zu einer T-Zelldifferenzierung und -proliferation kommen kann. Die Differenzierung führt zu Effektorzellen, die in zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic t-cells*, CTLs) und T-Helferzellen unterteilt werden können. Die CTLs sind lytisch aktiv und können so infizierte Zellen eliminieren. T-Helferzellen aktivieren durch ihre Zytokinproduktion weitere Zellen, wie Makrophagen, die das Antigen beseitigen sollen. Neben den Effektorzellen werden sowohl in der B-Zellpopulation als auch in der T-Zellpopulation Gedächtniszellen ausgebildet (Ahmed und Gray, 1996). Die Entwicklung eines solchen sog. immunologischen Gedächtnisses erfolgt nach dem ersten Kontakt mit einem Krankheitserreger und kann bei erneuter Infektion mit demselben Erreger die Stärke der Erkrankung vermindern bzw. eine Erkrankung vollkommen verhindern. Die Bildung solcher langlebigen, in großer Anzahl vorkommender und schnell reagierender Gedächtniszellen gegen eine Reinfektion ist Ziel aller Vakzine (Masopust *et al.*, 2004).

1.2.2 Antigenpräsentation

Konnte ein Mikroorganismus in den Körper eindringen, muss er als fremd erkannt werden. Diese Aufgabe wird von den Makrophagen und den dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) erfüllt, die zu den sog. antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APCs) gehören. Vorläufer-DCs zirkulieren durch das Blut, die Lymphe und das Lymphgewebe. Unreife DCs befinden sich im peripheren Gewebe, wie Haut und Schleimhaut. Die in der Haut residierenden DCs sind sog. Langerhans-Zellen, die nach Antigenaufnahme aus dem peripheren Gewebe über die afferenten Lymphbahnen in das Lymphgewebe einwandern und währenddessen zu professionellen APCs heranreifen. Die internalisierten Antigene werden im Zytosol der APC zu Peptidfragmenten prozessiert und auf MHC-Moleküle geladen. Dieser Peptid/MHC-Komplex wird dann an die Oberfläche der APCs transportiert und dort präsentiert, um die zirkulierenden naiven T-Zellen zu aktivieren. Bei unreifen DCs ist diese Antigenpräsentation ineffizient, da sie kaum MHC-Moleküle und kostimulatorische Moleküle exprimieren, die zu einer T-Zellaktivierung benötigt werden. Während der Reifung wird sowohl die Expression der MHC-Moleküle als auch die der kostimulatorischen Moleküle erhöht, so dass die in Milz und Lymphknoten eingewanderten APCs T-Zellen erfolgreich stimulieren können (Banchereau *et al.*, 2000; Banchereau und Steinman, 1998). APCs können auf zwei verschiedenen Wegen Antigene präsentieren. Extrazelluläre Antigene werden über den endozytotischen Weg prozessiert und über MHC-Klasse II-Moleküle CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Die Degradation von intrazellulären Antigenen hingegen findet im Zytosol der APCs statt, wie auch die Bindung an die MHC-Klasse I-Moleküle, zur Erkennung für die CD8⁺ T-Zellen. MHC-Klasse I-Moleküle sind konstitutiv auf allen kernhaltigen Zellen und präsentieren endogene Antigene, sowie im Zytosol degradierte Proteine die von intrazellulär lebenden Mikroorganismen stammen. Über MHC-Klasse I-Moleküle werden Peptide mit einer Größe von neun bis maximal 10 Aminosäuren den CD8⁺ T-Zellen präsentiert. MHC-Klasse I-Moleküle sind aus einer schweren α -Kette und einem β 2-Mikroglobulinmolekül aufgebaut, welche eine geschlossene Peptidbindungstasche miteinander bilden.

Die Expression von MHC-Klasse II-Moleküle hingegen ist nur auf einigen wenigen Zellen zu sehen, wie B-Zellen, Makrophagen und DCs. Die über Phagozytose aufgenommenen exogenen Proteine werden im Endosom zu Peptiden von 10-13 Aminosäuren degradiert und an MHC-Klasse II-Moleküle gebunden. Das MHC-Klasse II-Molekül besteht aus einer α - und einer β -Kette, die eine Peptidbindungstasche mit offenem Ende bilden. Dieser Peptid/MHC-Klasse II-Komplex wird an die Oberfläche der APC transportiert und dort den CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Neben diesem klassischen MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Präsentationsweg

gibt es noch die sog. Kreuzpräsentation (*cross presentation*), in der exogene Antigene über MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden können (Rock *et al.*, 1990).

1.2.3 T-Zellaktivierung

T-Zellen lassen sich aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle $CD4^+$ und $CD8^+$ in zwei Klassen unterteilen, da sie nach ihrer Entwicklung im Thymus nur einen dieser beiden Korezeptoren exprimieren. Der T-Zellrezeptorkomplex der T-Zellen baut sich aus zwei transmembranen Polypeptidketten auf, der bei 95% der T-Zellen aus einer α - und einer β -Kette, sowie den beiden Proteinen CD3 und ξ , aufgebaut ist. Die extrazelluläre Region des $\alpha\beta$ -Heterodimers ist für die spezifische Erkennung des Antigen/MHC-Komplexes zuständig, CD3 und ξ liefern nach einer Bindung an die APC Signale an die T-Zelle, so dass es zu deren Stimulierung kommen kann. Der Aktivierungsprozess einer antigenspezifischen T-Zelle hängt, neben der Erkennung des spezifischen Antigens auf den MHC-Molekülen der APCs, von weiteren Faktoren ab. Die APCs müssen über kostimulatorische Moleküle verfügen, von denen die wichtigsten CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) sind, die an den Rezeptor CD28 auf den T-Zellen binden. Ausschließlich diese Interaktion des TCR mit dem Peptid/MHC-Komplex und den beiden kostimulatorischen Molekülen mit CD28 führt zu einer Aktivierung naiver T-Zellen, so dass es zu einer Differenzierung in Effektorzellen kommen kann. Fehlen die kostimulatorischen Moleküle auf den APCs, kommt es zur Apoptose oder zur Anergie der T-Zelle. Anergische T-Zellen können sich auch bei einem weiteren Kontakt mit dem Antigen nicht mehr zu Effektorzellen entwickeln. Dadurch wird verhindert, dass autoreaktive T-Zellen gesundes körpereigenes Gewebe angreifen (Abbas, 2000). Nach einer erfolgreichen Aktivierungsphase und einer nachfolgenden Expansionsphase, die mit dem Entfernen des pathogenen Erregers durch die Effektorzellen einhergeht, folgt die Kontraktionsphase. In dieser kommt es zur Apoptose von etwa 90% der Effektor T-Zellen, da die Überlebenssignale für die Effektorzellen durch das fehlende Antigen stark abnehmen. Gleichermäßen wichtig ist das Überleben einiger T-Zellen und deren Entwicklung zu Gedächtniszellen, deren Aufrechterhaltung durch homeostatische Proliferation kontrolliert wird, um gegen zukünftige Infektionen zu schützen (Dooms und Abbas, 2002).

1.2.3.1 $CD4^+$ T-Zellen

$CD4^+$ T-Zellen sind T-Helferzellen (*T helper cells*, Th), die aufgrund ihres unterschiedlichen Zytokinmusters in Th1- und Th2-Zellen unterteilt werden können, die jeweils verschiedene Immunantworten auslösen. Aktivierte Th1-Zellen sekretieren IL-2 und IFN- γ , Th2-Zellen IL-

4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Agarwal und Rao, 1998; Seder und Paul, 1994). Während der CD4⁺ T-Zelldifferenzierung entscheiden Zytokine, die während der T-Zellaktivierung in der direkten Umgebung vorhanden sind, über die Th1- oder Th2-Induktion. Die Sekretion von IL-12 durch aktivierte Makrophagen und DCs führt zu einer Differenzierung in Th1-Zellen. In Anwesenheit von IL-4 hingegen kommt es zur Induktion einer Th2-Antwort. Th1- und Th2-Zellen können durch ihre jeweiligen Zytokine positiv autokrin wirken, wie auch inhibierend auf ihren Gegenspieler. Außerdem bedingen die Th1- und Th2-Zellen durch ihre Zytokinsekretion bestimmte Immunantworten. Die Sekretion von IL-2 durch die Th1-Zellen wirkt autokrin und gewährleistet damit die klonale Expansion. Das sekretierte IFN- γ führt zur Aktivierung weiterer Makrophagen, es wird demzufolge zelluläre Immunität vermittelt (Abbas, 2000). Die Th1-Antwort ist kennzeichnend bei einer Infektion mit intrazellulären Bakterien und Viren (Biron und Gazzinelli, 1995; Hsieh *et al.*, 1993; Macatonia *et al.*, 1995). Bei Infektionen mit extrazellulären Parasiten und bei Allergien kommt es zur Differenzierung der naiven T-Zellen in Th2-Zellen. Th2-Zellen aktivieren durch ihre Zytokinproduktion B-Zellen, sowie Eosinophile und Mastzellen, wodurch die humorale Immunität unterstützt wird. Eine andere wichtige Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen, die autoreaktive T-Zellen supprimieren und antigenspezifische Immunreaktionen kontrollieren (Asseman und von Herrath, 2002; Macatonia *et al.*, 1995).

1.2.3.2 CD8⁺ T-Zellen

Die durch CD8⁺ T-Zellen vermittelte Immunantwort beruht auf der Eliminierung von infizierten oder entarteten Zellen.

Naive CD8⁺ T-Zellen zirkulieren in den sekundären lymphatischen Organen, um auf infizierte Zellen zu treffen. Kommt es nach erfolgreicher Erkennung eines Peptid/MHC-Klasse I-Komplexes zu einer Aktivierung und Differenzierung der naiven CD8⁺ T-Zellen, entwickeln sie sich zu antigenspezifischen CTLs. Die CTLs induzieren die Synthese von den Effektormolekülen IFN- γ und TNF, sowie die Lyse infizierter Zellen. IFN- γ aktiviert weitere Makrophagen und führt zu einer verstärkten MHC-Klasse I-Expression. TNF rekrutiert Leukozyten, indem es die Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen in den Endothelzellen stimuliert. In dieser Expansionsphase verändert sich außerdem die Expression einiger Oberflächenmoleküle, so dass es den CTLs ermöglicht wird, die lymphatischen Organe zu verlassen und zu den Infektionsherden zu wandern (Harty *et al.*, 2000). Die zytotoxische Lyse von infizierten Zellen kann über zwei unterschiedliche Wege induziert werden, zum einen durch Perforine und Granzyme, die in die Zielzellen eindringen, zum

anderen durch eine erhöhte Expression von FasL auf den CTLs, welcher an den Fas-Rezeptor der Zielzellen bindet. Beide Wege aktivieren Kaspasen in der Zielzelle, die zur Apoptose-Induktion führen (Shresta *et al.*, 1998). Nach der Expansion und Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen folgt die Kontraktionsphase, die mit der Eliminierung des Krankheitserregers korreliert. Während der Kontraktionsphase werden etwa 90% der Effektor CD8⁺ T-Zellen abgetötet. Die Apoptose-Induktion während der Kontraktionsphase wird durch verschiedene Mechanismen vermittelt. Zum einen kommt es zur Reduzierung der Produktion von ‚Überlebens-Zytokinen‘, zum anderen werden Fas-Rezeptoren und TNF-Rezeptoren auf den T-Zellen exprimiert, was zum Tod der Effektor T-Zellen führt. Bei den überlebenden T-Zellen handelt es sich um langlebige T-Gedächtniszellen. Diese behalten ihre Antigen-spezifität bei und werden durch kontinuierliche Proliferation in stabiler Anzahl im Wirt aufrechterhalten (Sprent und Surh, 2001; Zinkernagel, 2000).

1.2.4 Das immunologische Gedächtnis

Die Programmierung naiver T-Zellen zu T-Gedächtniszellen findet sehr früh während der ersten Immunantwort statt. Sie hängt unter anderem von der Signalstärke des Antigens ab. Wird das Signal beispielsweise von einer unreifen DC vermittelt, kann es zwar zur Proliferation kommen, es werden jedoch keine Rezeptoren für die homoestatischen Zytokine ausgebildet (Gett *et al.*, 2003). Die Stärke des TCR-Signals und die damit einhergehende Zytokinrezeptor-Expression beeinflussen somit die Differenzierung, so dass programmierte T-Zellen verschiedene Differenzierungsstadien erreichen können (Lanzavecchia und Sallusto, 2002). So scheinen nicht alle T-Zellen in das Effektorstadium einzutreten, sondern auch in intermediären Stadien zu verbleiben. T-Zellen in diesem intermediären Stadium exprimieren wieder *homing*-Rezeptoren für die sekundären Lymphorgane und überleben nach Antigen-Eliminierung als zwei verschiedene Gedächtnis-Subpopulationen, den zentralen T-Gedächtniszellen T_{ZM} und den Effektor T-Gedächtniszellen T_{EM} (Sallusto *et al.*, 2004). Wie kommen solche verschiedenen Signalstärken bei ein und derselben Antigenantwort zustande? Die Signalstärke hängt von der Konzentration des Antigens und den kostimulatorischen Molekülen ab, wie auch von der Dauer der Interaktion zwischen T-Zelle und APC, die zwischen Stunden und Tagen anhalten kann (Gunzer *et al.*, 2000). Die unterschiedlichen Signalstärken sind möglicherweise vom Zeitpunkt der Stimulation abhängig. Zu einem frühen Zeitpunkt existiert eine große Anzahl an reifen APCs, die eine ausreichende Menge an Antigen präsentieren und dementsprechend Zytokine sekretieren. Dies führt zu einer massiven Proliferation antigenspezifischer T-Zellen und zu einer Entwicklung in CTLs, von

denen einige als T_{EM} überleben. Zu einem späteren Zeitpunkt ändern sich die Stimulationsbedingungen grundlegend. Es sind weniger DCs im Umlauf, die zudem eine geringere Menge an Antigen präsentieren und deren Zytokinproduktion erschöpft ist (Langenkamp *et al.*, 2000), so dass es in diesem Fall wahrscheinlich zu einer Expansion von Nicht-Effektor T-Zellen kommt, von denen die fittesten als T_{ZM} überleben. Laut diesem Modell würden die Vorläuferzellen der T_{EM} zu einem frühen Zeitpunkt generiert, wohingegen die Vorläuferzellen der T_{ZM} zu einem späteren Zeitpunkt der Immunantwort generiert würden (Lanzavecchia und Sallusto, 2000).

Im Mausmodell hingegen scheint die Entwicklung von Effektorzellen und Gedächtnis-Zellen linear abhängig zu sein. Mit Hilfe von adoptiven Transferversuchen konnte gezeigt werden, dass T_{EM} in T_{ZM} übergehen können. Des Weiteren wandeln sich nach zweiter Antigen-Stimulierung T_{ZM} zu T_{EM} , dies geschieht jedoch nicht in Abwesenheit von Antigen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass T_{EM} und T_{ZM} im murinen Modell nicht aus unterschiedlichen Vorläuferzellen hervorgehen, sondern sich aus einem linear verlaufenden Differenzierungsweg entwickeln: naive T-Zellen \rightarrow CTLs \rightarrow T_{EM} \rightarrow T_{ZM} . Es wird davon ausgegangen, dass die T_{ZM} -Population die wichtigste Rolle beim Schutz vor einem zweiten Antigenkontakt spielt (Kaech *et al.*, 2002; Seder und Ahmed, 2003; Wherry *et al.*, 2003). Dieser Entwicklungsweg wird jedoch kontrovers diskutiert. Die Gruppen Busch und Oxenius postulieren eine Entwicklung von der naiven T-Zelle über ein intermediäres T-Zellstadium hin zur T_{ZM} -Population (Huster *et al.*, 2006) und zur T_{EM} -Population (Bachmann *et al.*, 2004). Die T_{EM} -Population differenziert zu funktionellen T_E , diese Entwicklung ist jedoch unidirektional, d.h. differenzierte CTLs können nicht mehr in Gedächtniszellen umgewandelt werden. In diesem Modell ist die T_{EM} -Population die wichtigste schützende Subpopulation.

1.2.5 Charakterisierung der T-Gedächtniszellen mittels Oberflächenmarker

1.2.5.1 Humane Marker

Die Identifizierung von naiven und $CD8^+$ T-Gedächtniszellen im humanen System findet durch die Expression von CD45-Isoformen auf der $CD8^+$ T-Zelle statt. Naive T-Zellen exprimieren CD45RA, $CD8^+$ T-Gedächtniszellen haben die Isoform CD45RO auf ihrer Oberfläche, wobei ein Subtyp der Gedächtniszellen ebenfalls CD45RA exprimiert. Ein weiterer Rezeptor, der zur Unterscheidung der $CD8^+$ T-Zellsubpopulationen dient, ist CCR7, ein Chemokinrezeptor, der die Migration in sekundäre Lymphorgane zulässt. CCR7 wird deshalb als *homing*-Rezeptor bezeichnet, der in Kombination mit CD45 eine Unterscheidung

in die zwei Subtypen der T-Gedächtniszellen ermöglicht, siehe Abb. 1: T_{ZM} - $CCR7^+/CD45RA^-$ und den Effektor T-Gedächtniszellen, die sich nochmals unterscheiden lassen, in T_{EM} - $Perforin^{high} CCR7^-/CD45RA^+$ und T_{EMRA} - $Perforin^{low} CCR7^-/CD45RA^-$ (Geginat *et al.*, 2003).

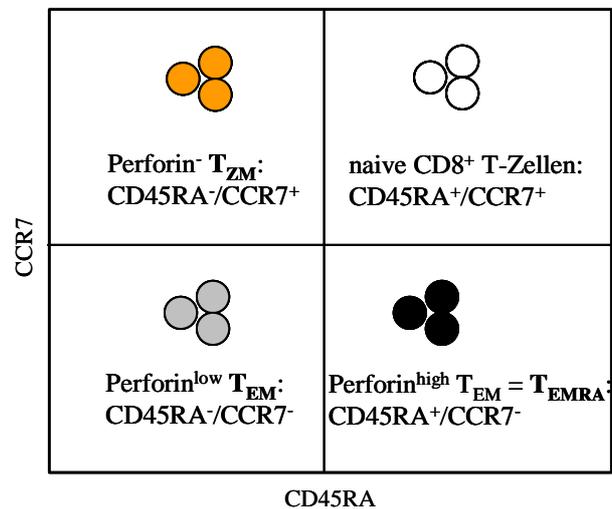


Abbildung 1: Schematische Darstellung der humanen CD8⁺ T-Zellsubpopulationen. Charakterisierung der CD8⁺ T-Zellsubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker.

Bei den T_{ZM} handelt es sich um ruhende Zellen, die für die lebenslange Aufrechterhaltung einer antigenspezifischen Immunantwort verantwortlich sind. Die T_{EM} -Population besteht aus aktiven T-Zellen, die wichtig zur Bereitstellung einer sofortigen Effektorfunktion nach einem zweitem Antigenkontakt sind (Sallusto *et al.*, 1999). $CD8^+$ und $CD4^+$ T_{EM} produzieren innerhalb von Stunden nach Antigenkontakt $IFN-\gamma$, $IL-4$ und $IL-5$, d.h. der humane T_{EM} -Bestand besteht aus CTLs, Th1- und Th2-Zellen. T_{ZM} sekretieren hauptsächlich $IL-2$. Nach erneutem Antigenkontakt sind T_{ZM} in der Lage, sofort zu proliferieren und es kommt zur Differenzierung in eine große Anzahl an effizienten $IFN-\gamma$ - oder $IL-4$ -produzierenden antigenspezifischen Effektorzellen.

1.2.5.2 Murine Marker

Im murinen Modell können diese beiden Gedächtnis-Zellpopulationen inzwischen ebenfalls voneinander unterschieden werden. Dies wurde durch den kürzlich entdeckten Oberflächenmarker CD127 ($IL-7$ Rezeptor α -Kette) möglich, der in Kombination mit dem *homing*-Rezeptor CD62L (L -Selektin) eine Unterscheidung zulässt. Vorher war diese Unterscheidung nicht möglich, da die humanen phänotypischen Oberflächenmarker nicht auf

das Maussystem übertragbar sind. Der IL-7 Rezeptor wird auf allen ruhenden peripheren $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen exprimiert. Er besteht aus zwei Ketten, der α -Kette (CD127) und der γ -Kette ($\gamma_c/CD132$), letztere ist zudem ein Anteil des IL-2 Rezeptors (Marrack und Kappler, 2004).

Die beiden murinen Gedächtniszellpopulationen sind durch folgende Oberflächenmarker gekennzeichnet, siehe auch Abb. 2: T_{ZM} - $CD127^{high}/CD62L^{high}$, T_{EM} - $CD127^{high}/CD62L^{low}$. Die Effektor T-Zellen exprimieren keinen der beiden Marker: T_E - $CD127^{low}/CD62L^{low}$ (Huster *et al.*, 2004). Wie im humanen System existieren auch T-Zellen, die sich in einem intermediären Aktivierungsstadium befinden T_{int} - $CD127^{low}/CD62L^{high}$ (Bachmann *et al.*, 2005; Huster *et al.*, 2006).

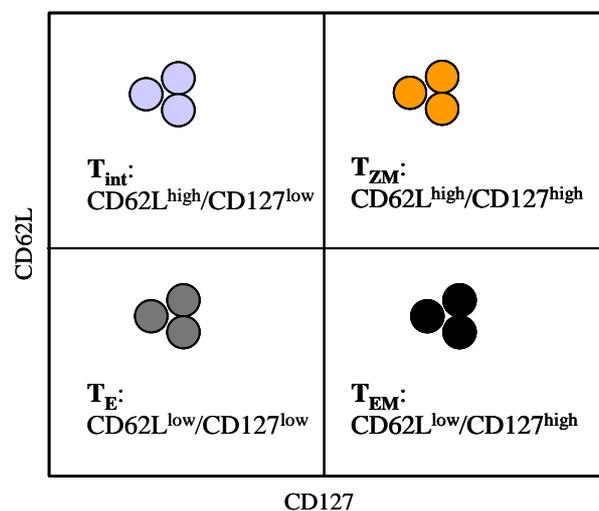


Abbildung 2: Schematische Darstellung der murinen $CD8^+$ T-Zellsubpopulationen. Charakterisierung der $CD8^+$ T-Zellsubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker.

Diese beiden Gedächtniszellsubtypen unterscheiden sich in ihrem Zytokinprofil, in ihrer Proliferationskapazität und in ihrem Migrationsmuster, ähnlich den Ergebnissen aus den Untersuchungen der humanen Gedächtniszellen. T_{ZM} und T_{EM} können unterschiedlichen anatomischen Kompartimenten zugeordnet werden. T_{EM} sind größtenteils in nicht-lymphatischen Organen wie beispielsweise Lunge, Leber und Darm zu finden. Sie zeigen nach einem erneuten Antigenkontakt eine sofortige Effektorfunktion, indem sie $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ produzieren. Ihre Proliferationskapazität aufgrund TCR-vermittelter Stimulation ist gemäßigt (Bachmann *et al.*, 2005; Huster *et al.*, 2006).

T_{ZM} sind vornehmlich in lymphatischen Organen lokalisiert. Die Lokalisation in den Lymphknoten und der Milz wird durch den *homing*-Rezeptor CD62L bedingt (humane und

murine Zelllokalisierung), der für die Adhäsion an die HEVs (*high endothelial venules*) verantwortlich ist. Diese Lokalisation wird bei den humanen Zellen zusätzlich durch den Chemokinrezeptor CCR7 unterstützt (Campbell *et al.*, 2001; Huster *et al.*, 2004; Sallusto *et al.*, 2004). T_{ZM} können nach zweitem Antigenkontakt stark expandieren und produzieren IL-2. Es zeigte sich jedoch, dass T_{ZM} keine klassische Effektorfunktion ausüben, da sie weder IFN- γ noch TNF- α produzieren oder zytotoxisch wirken (Huster *et al.*, 2004).

Mit Hilfe des CD127-Oberflächenmarkers können möglicherweise wichtige Details über die beiden verschiedenen Gedächtnis-Zellpopulationen aufgeklärt werden, die bezüglich der Entwicklung von neuen Vakzinierungs-Strategien eine große Rolle spielen. Gerade das Profil der CD127/CD62L-Verteilung zu frühen Zeitpunkten nach Immunisierung deutet möglicherweise auf die Qualität der generierten Immunität hin.

1.2.6 Homeostase der T-Gedächtniszellen

Die Aufrechterhaltung von Gedächtniszellen nach einer Infektion ist ein dynamischer Prozess, der durch homeostatische Proliferation kontrolliert wird (Harty *et al.*, 2000). Die beiden wichtigsten Zytokine hierfür im murinen Modell sind IL-7 und IL-15, die von einer großen Anzahl an Zellen konstitutiv exprimiert werden (Schluns *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1998). Ursprünglich wurde IL-7 als B-Zell-Wachstumsfaktor identifiziert, außerdem gilt es als wichtiger Faktor in der B- und T-Zell-Lymphopoese (Murray *et al.*, 1989; Namen *et al.*, 1988). IL-7 wird von Epithelzellen des Thymus, des Darms und des Lymphgewebes produziert. Neben den CD8⁺-Gedächtniszellen benötigen auch naive T-Zellen das Zytokin IL-7 zum Überleben und zur Proliferation. Die Expression von IL-15 wird durch IFN-I induziert, dessen Produktion durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems induziert wird. Je nach Stärke der Aktivierung der angeborenen Immunität spielt bei der homeostatischen Proliferation der CD8⁺ Gedächtnispopulation IL-15 oder IL-7 die wichtigere Rolle (Lee und Surh, 2005).

Kommt es zur Aktivierung naiver T-Zellen durch Antigenstimulierung, wird die IL-7R α -Expression vermindert. Es kommt zur Sekretion von IL-2, welches wiederum die Expression von IL-2R α (CD25), IL-4R α (CD124) und IL-15R α induziert. Während der Expansionsphase können die aktivierten T-Zellen ohne IL-7 überleben (Schluns *et al.*, 2000). Mit Entfernung des Antigens kommt es wieder zu einer verstärkten Expression von IL-7R α , was entscheidend ist für das Überleben der T-Gedächtniszellen. Die anderen Zytokin-Rezeptoren hingegen werden nicht mehr exprimiert (Bradley *et al.*, 2005).

1.2.7 Die Rolle der CD4⁺-Hilfe bei der CD8⁺-Antwort

Die Vermittlung des Schutzes durch CD8⁺ T-Zellen ist neben den essentiellen Faktoren, die zur Aktivierung von effizienten CD8⁺ T-Zellantworten notwendig sind, auch von der Unterstützung der CD4⁺ T-Zellen abhängig. Frühe Arbeiten beschäftigten sich mit der Hypothese, dass CD4⁺ T-Zellen für eine primäre Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen notwendig sind, ähnlich wie sie zur vollständigen Stimulierung der B-Zellen benötigt werden (Castellino und Germain, 2006). Es konnte schnell gezeigt werden, dass sowohl nach einer viralen, als auch bakteriellen Infektion, eine starke antigenspezifische CTL-Antwort ohne CD4⁺ T-Zellhilfe generiert wird (Buller *et al.*, 1987; Wu und Liu, 1994). Demnach spielen CD4⁺ T-Zellen bei einer primären, effizienten Induktion der CD8⁺ T-Zellantwort gegen pathogene Erreger keine Rolle. Es zeigte sich allerdings, dass die Qualität der CD8⁺-Gedächtniszellen von der CD4⁺ T-Zellhilfe beeinflusst wird (Bourgeois *et al.*, 2002; Janssen *et al.*, 2003; Shedlock und Shen, 2003; Sun und Bevan, 2003). Untersuchte man nach einer Listerien-Infektion generierte CD8⁺-Gedächtniszellen aus CD4⁺ T-Zell-defizienten Mäusen, wurde festgestellt, dass sich die Anzahl dieser Zellen innerhalb eines Zeitraums von etwa 60 Tagen stark verringerte, im Gegensatz zu einer stabilen Aufrechterhaltung der Anzahl an T-Gedächtniszellen in Wildtyp-Mäusen (Sun und Bevan, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich diese CD8⁺-Gedächtniszellen nach einer Reinfektion weniger häufig teilen, weniger IFN- γ und IL-2 produzieren, und somit nicht mehr in der Lage sind, bei zweitem Antigenkontakt vollkommenen Schutz gegen den pathogenen Erreger zu vermitteln (Belz *et al.*, 2002; Janssen *et al.*, 2003; Shedlock und Shen, 2003; Sun und Bevan, 2003). Aus diesen Studien ging jedoch nicht hervor, zu welchem Zeitpunkt der CD8⁺ T-Zelldifferenzierung die CD4⁺ T-Zellhilfe benötigt wird, damit die Anzahl und Effizienz der CD8⁺-Gedächtniszellen über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt (Shedlock und Shen, 2003; Sun und Bevan, 2003). Der Zeitfaktor wird kontrovers diskutiert, da nicht vollständig geklärt ist, ob diese CD4⁺ T-Zellhilfe zu einem frühen Zeitpunkt, während der CD8⁺ T-Zellexpansion, oder zu einem späteren Zeitpunkt, nach der Eliminierung des Krankheitserregers, benötigt wird. Ein Großteil der Arbeitsgruppen hat Ergebnisse die dafür sprechen, dass die CD4⁺ T-Zellen in der ersten Phase der CD8⁺ T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle spielen, damit eine Programmierung zu optimalen Gedächtniszellen sichergestellt ist. Sie vertreten den Standpunkt, dass die CD4⁺ T-Zellhilfe zur Generierung der langlebenden Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen zu diesem frühen Zeitpunkt unablässig ist, so dass eine sofortige Antwort nach einem zweiten Antigenkontakt möglich wird (Bourgeois *et al.*, 2002; Janssen *et al.*, 2003; Kaech *et al.*, 2003). Die Arbeitsgruppe von Bevan hingegen konnte mit dem bakteriellen

Infektionsmodell für *Listeria monocytogenes* zeigen, dass die CD4⁺ T-Zellhilfe ausschließlich zur Aufrechterhaltung der generierten CD8⁺ Gedächtniszellen benötigt wird, d.h. die CD4⁺ T-Zellen erst zu einem späteren Zeitpunkt während der CD8⁺ T-Zellentwicklung essentiell sind. Bei der primären Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen hingegen beeinflusst die CD4⁺ T-Zellhilfe die Gedächtniszellentwicklung nicht (Bevan, 2004).

1.3 Salmonellen

1.3.1 Salmonellen als Krankheitserreger

Infektionen durch *Salmonella* spp., einem Gram-negativen intrazellulären Bakterium, das zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehört, stellen ein anhaltendes Erkrankungsrisiko für den Menschen dar. Die Einteilung der Salmonellen in mehr als 2300 Serotypen (Serovare) erfolgt aufgrund ihrer O- und H-Antigene, wobei jedes Serovar eine spezifische Antigenformel aufweist (charakteristische Kombination mehrerer Antigene). Die Serotypen werden im Kauffmann-White-Schema geordnet und anhand der O-Antigene zu Serogruppen zusammengefasst. Das O-Antigen ist eine Komponente des Lipopolysaccharids (LPS), einem Bestandteil der äußeren Bakterienmembran. LPS wird bei der Lyse der Bakterien freigesetzt. Es besteht aus dem Lipid A und einem Kernpolysaccharid, wobei das Lipid A toxisch wirkt. Bei Freisetzung von LPS kommt es zur Komplementaktivierung mit einhergehendem Fieber. Das H-Antigen ist das sog. Geißel-Antigen. Bei den Serovaren Typhi, Paratyphi C und Dublin gibt es zusätzlich das Vi-Antigen, ein Kapselantigen welches mit einem Schutz vor Phagozytose und einer Reduzierung der minimalen Infektionsdosis korreliert.

Nach einer *Salmonella enterica*-Infektion können verschiedene Krankheitsbilder beim Menschen beobachtet werden. *S. enterica* Serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) und Serovar Enteritidis (*S. enteritidis*) verursachen eine Gastroenteritis. Sie dringen über die M-Zellen und Enterozyten des terminalen Ileums ein und induzieren in der Lamina propria des Ileums eine lokale Entzündung, die zu Durchfall führt. *S. enterica* Serovar Typhi (*S. typhi*) und Serovar Paratyphi (*S. paratyphi*) hingegen führen zu den systemischen Infektionen Typhus bzw. Paratyphus. Nach erfolgreichem Eindringen der oral aufgenommenen Salmonellen breiten sie sich über den Blutweg aus und vermehren sich in Leber, Milz und Knochenmark. Weltweit erkranken jährlich noch 16 Millionen Menschen an Typhus, von denen etwa 600.000 versterben (Parry *et al.*, 2002). *S. typhi*-Infektionen werden vornehmlich durch kontaminierte Nahrung oder kontaminiertes Wasser verursacht. Die Infektionsdosis liegt bei 10² bis 10³ Bakterien.

1.3.2 Pathogenese von *S. typhimurium* in Mäusen

Da es sich bei *S. typhi* um einen humanpathogenen Erreger handelt, der demnach im Mausmodell nicht virulent ist, wurden attenuierte *S. typhimurium*-Stämme hergestellt. Infektionen mit *S. typhimurium* führen in der Maus zu einem typhösen, d.h. systemischen Krankheitsbild (Eisenstein, 1999), so dass eine *S. typhimurium*-Infektion in der Maus als experimentelles Modell für die Typhuserkrankung beim Menschen verwendet wird (Tsolis *et al.*, 1999).

Die primäre Eintrittspforte von *S. typhimurium* nach der Passage des Magens ist das terminale Ileum. Von dort aus dringen die Salmonellen über Enterozyten, bevorzugt jedoch über die M-Zellen auf den Peyerschen-Plaques (PP) des Ileums, aktiv in den Wirt ein (Jones und Falkow, 1994). Es folgt die Infektion benachbarter Enterozyten, sowie das Vordringen zu den Lymphfollikeln der PP. Daran schließt sich die Invasion der Salmonellen in nicht-phagozytische und phagozytische Wirtszellen. Diese aktive Invasion in die Wirtszellen führt zur Ausbreitung der Salmonellen in die mesenterialen Lymphknoten, die Leber und die Milz (Parry *et al.*, 2002; Spreng *et al.*, 2006). Die Fähigkeit der Salmonellen, in den eukaryontischen Wirtszellen intrazellulär zu überleben und sich dort zu replizieren, führt letztendlich zu einer systemischen Ausbreitung der Bakterien (Galan und Ginocchio, 1994; Marriott *et al.*, 1999).

Während des intrazellulären Lebenszyklus verbleiben die Salmonellen in einem membrangebundenen Kompartiment, einer sogenannten *Salmonella-containing vacuole* (SCV), auch Makropinosom genannt. Die Fähigkeit, innerhalb der SCV in eukaryontischen Zellen zu persistieren und sich zu replizieren ist das Pathogenitätsprinzip von *S. typhimurium* (Abrahams und Hensel, 2006; Alpuche-Aranda *et al.*, 1994). In der ersten Phase des Infektionsverlaufs kommt es innerhalb von Stunden über das Blut- und Lymphsystem zur Ausbreitung der Salmonellen im Organismus. Die darauffolgende zweite Phase hält mehrere Tage an, in der die intrazelluläre Replikation der Salmonellen stattfindet und ansteigende Bakterienzahlen in Leber und Milz festzustellen sind. Das intrazelluläre Wachstum in der SCV ist überlebensnotwendig für die Salmonelle (Mittrucker *et al.*, 2002).

1.3.3 Typ III-Sekretionssysteme von *S. typhimurium*

Man unterscheidet innerhalb Gram-negativer Bakterien die Proteinsekretionssysteme der Typen I-IV. Der Begriff Sekretion bezeichnet in diesem Zusammenhang den aktiven Transport von Proteinen aus dem Zytoplasma des Bakteriums über die innere und äußere Membran in das umgebende Medium oder auf die Oberfläche der bakteriellen Zelle (Hueck,

1998). Über das Typ I-Sekretionssystem wird beispielsweise das Hämolyisin aus *E. coli* sekretiert. Die über das Typ II-Sekretionssystem exportierten Proteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz, die während des Transportes abgespalten wird. Die Sekretion von Pullulanase durch *Klebsiella oxytoca* ist ein gut untersuchtes Beispiel für das Typ II-Sekretionssystem (Pugsley, 1993). Das Typ III-Sekretionssystem (T3SS) besteht aus mehr als 40 Proteinen und existiert in zahlreichen Gram-negativen humanpathogenen Erregern wie *Yersinia*, *Shigella* und enteropathogenen *E. coli*. Es dient zur Sekretion von Effektorproteinen aus dem bakteriellen Zytosol und der anschließenden Translokation dieser Proteine in eukaryontische Wirtszellen. Im Gegensatz zu den Typ II-Effektorproteinen besitzen die Typ III-Effektorproteine keine N-terminale *sec*-Sequenz, die Sekretion erfolgt durch die sog. Nadelkomplex-Struktur des T3SS.

Der Nadelkomplex, über den die Proteine sekretiert werden, zeigt Homologien zu dem Flagellen-Exportapparat, da seine Strukturen im Elektronenmikroskop als zylindrischer Basalkörper zu erkennen sind, was dem flagellaren Basalkörper ähnelt (Kubori *et al.*, 1998). Der Zylinder besteht aus zwei Paaren von Ringen, die sowohl die innere als auch die äußere Membran der bakteriellen Zellwand umspannen, zusammengehalten von einem Stab, wie in Abb. 4 dargestellt. An den Zylinder schließt sich eine nadelähnliche Struktur. Der innere Ring besteht aus dem Protein PrgH, die äußeren beiden Ringe, assoziiert an die äußere Zellmembran und an die Peptidoglykanschicht, bestehen aus einem Protein der Sekretinfamilie, dem InvG. Die Zwischenverbindung bildet das Protein PrgK. Die Hauptuntereinheit der Nadelstruktur ist das PrgI (Kubori *et al.*, 2000). InvC ist an der inneren Membran lokalisiert und besitzt eine ATPase-Aktivität, der Energielieferant für das T3SS. Aufgrund dieser Strukturen wird die Translokation der Effektorproteine auch als Mikroinjektion bezeichnet (Galan, 1998; Kubori *et al.*, 1998).

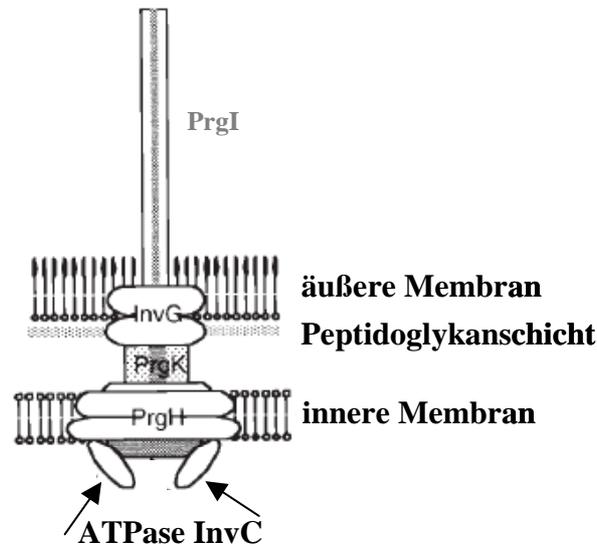


Abbildung 3: Aufbau des T3SS-Nadelkomplexes von *S. typhimurium* (nach Galan 1999). Es handelt sich hierbei um einen schematischen Aufbau des Nadelkomplexes mit seinen bekannten Komponenten. Die Lokalisation der Komponenten ist hypothetisch, weitere existierende Proteine sind nicht auszuschließen.

Die komplexe Pathogenese der *S. typhimurium*-Infektion wird durch eine Anzahl von Virulenzfaktoren bestimmt, deren Gene innerhalb großer, chromosomaler Bereiche lokalisiert sind, sog. Pathogenitätsinseln (PAIs). *S. typhimurium* besitzt zur Injektion der Virulenzfaktoren in eukaryontische Wirtszellen zwei Typ III-Sekretionssysteme (T3SS) die von den *Salmonella*-Pathogenitätsinseln 1 (SPI1) und 2 (SPI2) kodiert werden. Die injizierten Virulenzfaktoren bzw. Effektorproteine können die eukaryontischen Zielzellen so modifizieren, dass eine Kolonisierung der Salmonellen möglich ist und die Immunantwort des Wirtes moduliert wird (Hansen-Wester und Hensel, 2001).

Diese beiden T3SS der Salmonellen spielen während der Pathogenese eine unterschiedliche Rolle. SPI1 vermittelt die Invasion in die eukaryontischen Zellen, SPI2 ist für die Replikation und das Überleben innerhalb der Wirtszelle, sowie zur systemischen Infektion erforderlich (Galan, 1998; Hensel, 2000; Hueck, 1998; Schmidt und Hensel, 2004).

Das physiologische Signal welches die Aktivierung der SPI1-Gene auslöst, ist möglicherweise der Wirtszellkontakt. Neueste Studien zeigten, dass es zur Vorbereitung der Invasion von *Salmonella* in die Wirtszelle zu einer Cholesterollakkumulation in der eukaryontischen Zellmembran kommt, an das das *Salmonella*-Protein SipB binden kann, wodurch die SPI1-Expression angeschaltet wird (Hayward *et al.*, 2005; Hensel, 2000; Kuhle und Hensel, 2004). Diese zu einem frühen Zeitpunkt translozierten SPI1-Effektorproteine ermöglichen die Invasion des Bakteriums in die Wirtszelle, was innerhalb von Minuten bis

Stunden nach Infektion passiert (Collazo und Galan, 1997; Galan, 1998). Es handelt sich vornehmlich um Proteine, die kleine G-Proteine (Cdc42, Rac-1 und Rho) der Wirtszelle modifizieren können, so dass eine Umordnung des Aktinzytoskeletts induziert wird. Eines der wichtigsten SPI1-Proteine ist das *Salmonella outer protein E2* (SopE2). SopE2 ist ein Guaninnukleotid-Austausch-Faktor und ist somit in der Lage, Cdc42-c und Rac-1 zu aktivieren. Dadurch kommt es in der Wirtszelle zum sog. *membrane ruffling*, wodurch die Salmonelle über Makropinozytose in die eukaryontische Zelle eindringen kann (Bakshi *et al.*, 2000; Friebel *et al.*, 2001; Stender *et al.*, 2000). Ein weiteres SPI1-Effektorprotein ist die *Salmonella protein tyrosine phosphatase* (SptP), ein GTPase-aktivierendes Protein, welches die oben genannten kleinen G-Proteine hemmt, so dass das Aktinzytoskelett wieder in seinen ursprünglichen Zustand zurückversetzt wird (Fu und Galan, 1998; Kaniga *et al.*, 1996).

Nach Phagozytose oder induzierter Aufnahme über die SPI1-vermittelte Invasion befindet sich *S. typhimurium* in der SCV. Ab diesem Zeitpunkt wird die Expression der SPI1-Gene unterdrückt und es erfolgt die Induktion der SPI2-Genexpression wie in Abb. 3 schematisch dargestellt (Cirillo *et al.*, 1998). Ein Abbau der Vakuole durch den endosomalen Weg wird erfolgreich unterbunden, stattdessen kommt es zur Fusion mit Membrankomponenten, die zur Aufrechterhaltung der SCV dienen (Kuhle und Hensel, 2004). Kurz nach Invasion können in der SCV zwar zwei Markerproteine für frühe Endosomen bzw. verwertbare Endosomen nachgewiesen werden, das ‚frühe-endosomale‘ Antigen 1 (EEA1, *early-endosome antigen 1*) und der Transferrin-Rezeptor (TfR), welche aber sehr schnell durch charakteristische späte Endosomen- / Lysosomen-Proteine (z.B. LAMP-1-3) ersetzt werden (Hashim *et al.*, 2000).

Ab diesem späteren Zeitpunkt der Infektion kommt es zur Translokation der gebildeten SPI2-Proteine durch die Membran der SCV in das Wirtszytosol. Da die Produktion der SPI2-Effektorproteine während des gesamten intrazellulären Überlebens von *Salmonella* stattfindet, werden die Proteine über Tage bis Wochen transloziert und somit zytosolisch deponiert (Hensel *et al.*, 1998).

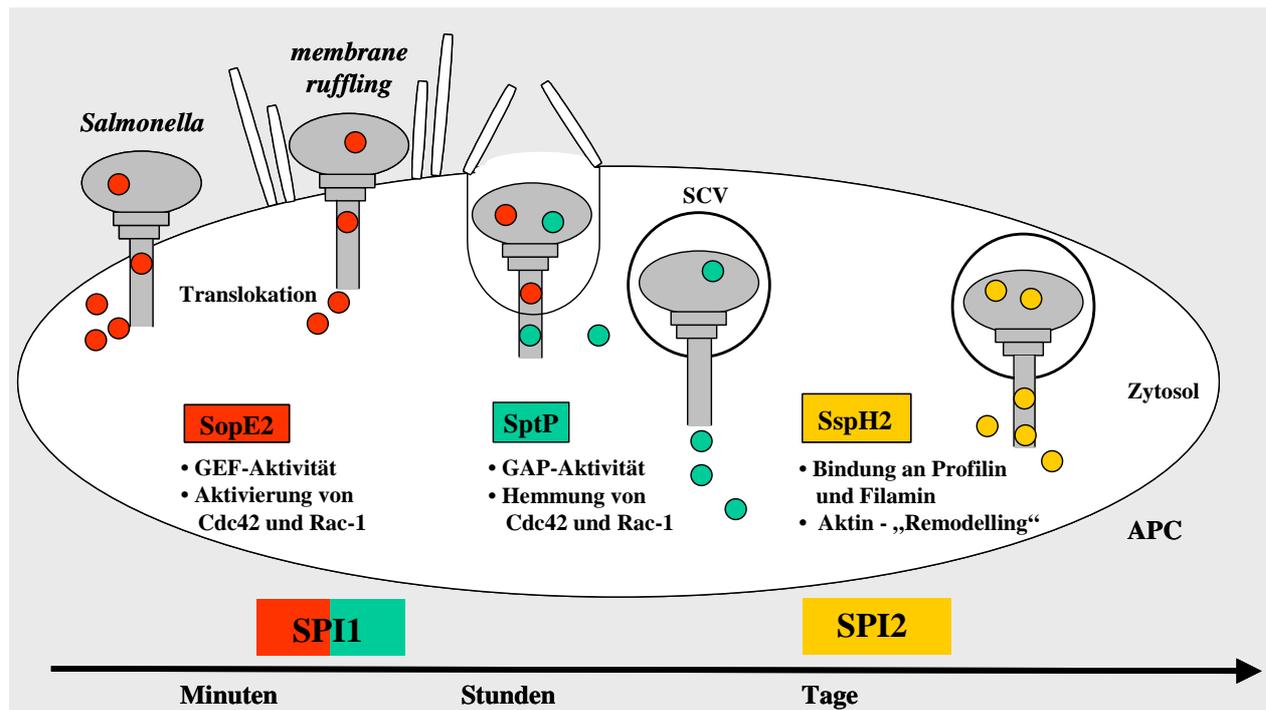


Abbildung 4: Schematische Darstellung des *Salmonella*-Infektionszyklus. Die frühe Aktivierung der SPI1-Effektorproteine zur Induktion einer erfolgreichen Invasion in die Wirtszelle. SopE2 aktiviert Cdc42 und Rac1, die entscheidend am Aktin-Zytoskelettaufbau beteiligt sind und zum *membrane ruffling* führen. Nach erfolgreicher Invasion und Bildung der SCV wird SptP transloziert, ein Gegenspieler zu SopE2, um das Aktin-Zytoskelett in den ursprünglichen Zustand zurückzusetzen. Die Expression der SPI1-Effektorproteine wird unterdrückt. Dann erst erfolgt die Bildung des SPI2-Effektorproteins SspH2, um das Überleben der *Salmonella* in der SCV sicherzustellen.

Das ausschlaggebende Signal für die Aktivierung der SPI2 wurde bislang nicht identifiziert. Es wird vermutet, dass das limitierte Nahrungsangebot in der SCV eine entsprechende Rolle spielen könnte (Kuhle and Hensel, 2004). Zur Zeit sind 16 Effektorproteine bekannt, die über das SPI2-kodierte T3SS transloziert werden (Abrahams und Hensel, 2006). SPI2-Mutantenstämme sind nicht fähig, in der Wirtszelle zu proliferieren und zeigen eine stark reduzierte Überlebensfähigkeit (Cirillo *et al.*, 1998; Shea *et al.*, 1999). Ein relativ gut charakterisiertes SPI2-Effektorprotein ist das SspH2, ein Leucin-reiches Protein. Der konservierte N-Terminus des SspH2 bindet an Filamin und Profilin. Diese Interaktion dient mutmaßlich zur Inhibierung der Aktin-Polymerisation (Cirillo *et al.*, 1998; Miao *et al.*, 2003; Miao und Miller, 2000).

Die Genexpression und die Bildung der SPI1- und SPI2-Effektorproteine findet zu verschiedenen Zeitpunkten des *Salmonella*-Infektionszyklus statt, d.h. die entsprechenden Moleküle werden sequentiell transloziert.

1.3.4 Salmonellen als Lebendvektor

Der Großteil humanpathogener Mikroorganismen wird oral aufgenommen bzw. gelangt über mukosale Oberflächen in den Körper. Die mukosale Infektion führt zu einer zellvermittelten Immunität in Form von CD4⁺ T-Zell- und CD8⁺ T-Zellantworten. Des Weiteren kommt es zu einer humoralen Antwort, da die Synthese von sekretorischem Immunglobulin A (sIgA) induziert wird. Die Stimulierung einer mukosalen und systemischen Immunantwort ist die optimale Voraussetzung, um einen langlebigen Schutz vor Infektionen zu erhalten. Mit Hilfe von attenuierten Mikroorganismen, die als orale Lebendvakzine eingesetzt werden, wird versucht, Schutz vor intrazellulären Erregern zu vermitteln (Cirillo *et al.*, 1998; Shata *et al.*, 2000; van Ginkel *et al.*, 2000). Während der verschiedenen Stadien der *Salmonella*-Infektion werden im Mausmodell humorale und zelluläre Komponenten des angeborenen und des adaptiven Immunsystems induziert. Während der Anfangsphase der Infektion haben die Phagozyten die zentrale Kontrolle über die eingedrungenen Salmonellen. Die Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten durch die Entzündungsmediatoren (TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ) ist ausschlaggebend für das Überleben der Maus (Vassiloyanakopoulos *et al.*, 1998). Das angeborene Immunsystem ist für einige Tage in der Lage das Wachstum der Salmonellen zu unterdrücken, bewältigt es jedoch nicht, die Bakterien zu eliminieren. Erst die Aktivierung des adaptiven Immunsystems macht eine Eliminierung der Salmonellen möglich. Es kommt zur Induktion einer B-zellvermittelten Immunantwort, deren Antikörper zum Schutz gegenüber einer *S. typhimurium*-Infektion beitragen können, sowie zur Induktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten.

Zur Vakzineentwicklung wurden attenuierte *Salmonella*-Stämme generiert, um sie als Lebendvektor gegen Erkrankungen, die durch Salmonellen verursacht werden, einzusetzen. Außerdem wurden Strategien entwickelt, um heterologe Antigene in den attenuierten Bakterien-Stämmen zu exprimieren und diese als Lebendvakzine gegen eine Reihe von Krankheitserregern einzusetzen (Mittrucker und Kaufmann, 2000). Aufgrund der Tatsache, dass Salmonellen gentechnisch einfach zu manipulieren sind, wurden verschiedene attenuierte *S. typhimurium*-Mutanten entwickelt. Bei der *aroA*-Mutante beispielsweise besteht eine Mutation in einem biosynthetischen Gen, wodurch der aromatische Aminosäure-Abbau von *Salmonella* gestört ist. Von der *aroA*-Mutante ist bekannt, dass sie nach oraler Vakzinierung für etwa vier Wochen im Körper persistiert und während dieser Zeit komplexe Immunantworten induziert (Kotton und Hohmann, 2004). Dieser Stamm ist demnach ein hervorragender Lebendvektor, da ein Gleichgewicht zwischen Attenuierung und Persistenz vorliegt. Eine weitere wichtige Mutante hat ein deletiertes PhoP/PhoQ-Regulon, welches als

negativer Regulator wirkt, indem es eine wichtige Rolle bei der Inhibierung der Fusion der SCV mit den späten endosomalen/ lysosomalen Proteinen spielt (Garvis *et al.*, 2001). Im Tiermodell wurden attenuierte *S. typhimurium*-Stämme als Träger für heterologe Antigene verwendet. So wurden unter anderem Proteine von *L. monocytogenes*, *Bacillus anthracis* und *Yersinia pestis* in rekombinanten Salmonellen exprimiert, um vor der entsprechenden Infektionskrankheit Schutz zu induzieren (Chatfield *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1999; Schodel und Curtiss, III, 1995).

Der Einsatz von rekombinanten Salmonellen als Lebendvektor ist jedoch nicht nur auf das Tiermodell beschränkt. In einer klinischen Studie mit Probanden wurde ein attenuierter *S. typhimurium*-Stamm (*phoP/phoQ*-Mutante) als Lebendvektor gegen *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) eingesetzt. Hierfür wurde ein rekombinanter *S. typhimurium*-Stamm hergestellt, der die Urease von *H. pylori* exprimiert. Mit diesem Lebendvektor konnte eine *H. pylori*-spezifische Immunantwort induziert werden (Angelakopoulos und Hohmann, 2000).

Ein bereits beim Menschen zugelassener *Salmonella*-Impfstoff gegen Typhus stellt der attenuierte *S. typhi*-Impfstamm Ty21a dar, der mit Erfolg eingesetzt wird (Impfschutz 60-90 %) (Hahn und von Specht, 2003).

1.3.5 Induktion von CD8⁺ T-Zellantworten mit *S. typhimurium* in der Maus

Die zellvermittelte Antwort spielt eine Rolle bei der Bekämpfung der Erstinfektion und auch bei der Schutzvermittlung vor einer Zweitinfektion (Mittrucker and Kaufmann, 2000). Sowohl *S. typhimurium*-Infektionen als auch rekombinante Salmonellen, die als Lebendvektor zur Sekretion heterologer Antigene eingesetzt wurden, induzieren vornehmlich eine CD4⁺ T-Zellantwort. Durch die Lokalisation der Salmonellen in der SCV führt die Sekretion des Fremdantigens in die Vakuole zu einem endosomalen Transport des Antigens an die Zelloberfläche, so dass es fast ausschließlich zur Antigenpräsentation über den MHC-Klasse II-Weg kommt, wie in Abb. 5 schematisch dargestellt (Wick *et al.*, 1994). Endosomal gebundene Salmonellen sind demnach keine idealen Lebendvektoren, um MHC-Klasse I-Antworten zu stimulieren.

Da CD8⁺ T-Zellen eine sehr wichtige Rolle bei der Eliminierung von intrazellulären Mikroorganismen spielen, wurde versucht, durch Verwendung des T3SS heterologe Antigene gezielt in das Zytoplasma von APCs zu translozieren und dadurch eine CD8⁺ T-Zellantwort zu induzieren.

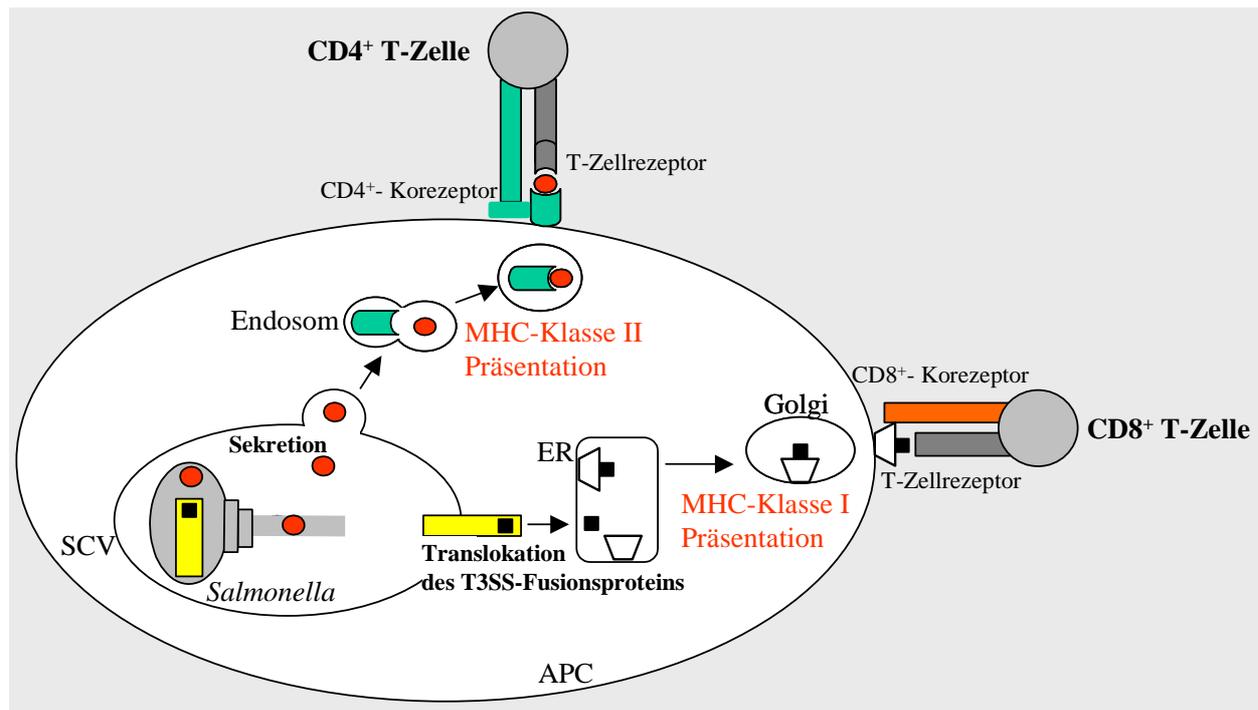


Abbildung 5: Schematische Darstellung der adaptiven Immunantwort nach einer *Salmonella*-Infektion. Aktivierung einer MHC-Klasse II-Präsentation aufgrund sekretierter Proteine in die SCV bzw. Induktion einer $CD8^+$ T-Zellantwort durch die T3SS-vermittelte Translokation von heterologen Antigenen in das Wirtszellzytosol durch intrazelluläre Salmonellen.

Hierfür wurde zunächst ein immundominantes Epitop des Influenza-Virus-Nukleoproteins (INVP) $INVP_{366-374}$ zwischen zwei funktionelle Domänen des bereits oben beschriebenen *Salmonella*-Proteins SptP inseriert. *In vitro* Versuche zeigten, dass mit Hilfe von SptP als Trägerprotein das $INVP_{366-374}$ in das Zytosol der Wirtszelle transloziert und über den MHC-Klasse I-Prozessierungsweg präsentiert wurde. Mit SptP/ $INVP_{366-374}$ oral immunisierte Mäuse zeigten antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellantworten (Rüssmann *et al.*, 1998). In einem weiteren Modell mit einem Fusionsprotein aus SptP und einem MHC-Klasse I-Epitop des Lymphozytären-Choriomeningitis-Virus (LCMV) waren oral immunisierte Mäuse durch antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellen vor einer letalen Infektionsdosis mit einem virulenten LCMV-Stamm geschützt (Rüssmann *et al.*, 1998). Der Einsatz von SptP als Trägerprotein für heterologe Antigene war allerdings auf kurze Proteine (45- 55 AS) beschränkt. Um dieses Antigen-Transportsystem als potentielles Vakzine gegen diverse Krankheitserreger einsetzen zu können, musste demzufolge ein weiteres Typ III-Effektorprotein identifiziert werden. Daher wurde das sehr gut charakterisierte Typ III-Effektorprotein *Yersinia outer protein E* (YopE) als Trägerprotein verwendet. YopE kann das Aktin-Zytoskelett von Makrophagen dahingehend manipulieren, dass die Phagozytose der Yersinien verhindert wird (Aepfelbacher *et al.*, 1999; Rosqvist *et al.*, 1991). Die für die T3SS-abhängige Translokation von YopE

benötigten Translokations- und Sekretionsdomänen sind bereits umfassend charakterisiert. YopE wurde als Trägerprotein für das heterologe p60-Antigen (mehr als 300 AS) von *L. monocytogenes* eingesetzt. Mit diesem YopE/p60-Fusionsprotein konnte gezeigt werden, dass YopE sowohl als Trägerprotein für heterologe Antigene in Yersinien als auch in Salmonellen verwendet werden kann (Rüssmann *et al.*, 2000; Rüssmann *et al.*, 2001). Die erfolgreiche Translokation von YopE/p60 durch das T3SS der Salmonellen führte bei oral immunisierten Mäusen zu hohen Frequenzen an p60-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, wodurch die Mäuse vor einer Listerien-Wildtypinfektion geschützt waren (Rüssmann *et al.*, 2001). YopE erwies sich demzufolge als ein geeignetes Typ III-Effektorprotein, um größere Proteinfragmente heterologer Mikroorganismen zytosolisch zu deponieren.

1.4 *Listeria monocytogenes* als Infektionsmodell

L. monocytogenes ist ein Gram-positives, fakultativ intrazelluläres Bakterium, das Infektionen in immunsupprimierten Menschen verursachen kann. Über kontaminierte Nahrung aufgenommen, kann es zu Krankheiten wie Enzephalitis, Meningitis oder zu Totgeburten führen. Verfolgt man den Infektionsweg von Listerien in der Maus, werden diese nach i.v.-Injektion von Makrophagen und Neutrophilen in Milz und Leber phagozytiert. Hier wird ein großer Anteil der Listerien eliminiert, einige jedoch gelangen aus dem Phagosom in das Zytosol der Wirtszelle. Das Entkommen aus dem Phagosom ist durch das Listeriolysin O (LLO) möglich, ein porenformendes Toxin (Harty *et al.*, 2000). Im Zytosol können sich die Listerien schnell vermehren und benutzen Aktinfilamente als Transportmittel um sich von Zelle zu Zelle ausbreiten. Auf diese Weise müssen die Bakterien den intrazellulären Raum nicht verlassen und sind somit vor Antikörpern und Komplement geschützt (Cossart, 2002).

Die frühe Kontrolle einer Primärinfektion mit *L. monocytogenes* hängt ausschließlich vom angeborenen Immunsystem ab. Diese Immunantwort reicht jedoch oft nicht, um die Bakterien komplett zu eliminieren. Konnten sich die Listerien in dem Wirtszellzytosol vermehren, setzt nach einigen Tagen die adaptive Immunantwort ein, da die Bakterien eine Anzahl von Proteinen in das Zytosol sekretieren, die über den MHC-Klasse I-Präsentationsweg an die Oberfläche der APC transportiert werden (Brunt *et al.*, 1990).

Die adaptive Immunantwort nach einer Primärinfektion in Mäusen ist somit durch eine dominante MHC-Klasse I vermittelte CD8⁺-Antwort gekennzeichnet, die eine komplette Eliminierung der Listerien ermöglicht und einen lebenslangen Schutz vermittelt. Die dominanten MHC-Klasse I-Epitope sind das LLO₉₁₋₉₉-Epitop und das p60₂₁₇₋₂₂₅-Epitop, ein

subdominantes Epitop ist das p60₄₄₉₋₄₅₇. Sie werden über das H2-K^d MHC-Klasse I-Molekül der BALB/c-Mäuse präsentiert (Vijh und Pamer, 1997). Das p60-Protein ist eine Mureinhydrolase, die bei der bakteriellen Septation wichtig ist.

Bei *L. monocytogenes* handelt es sich um ein sehr gut untersuchtes Infektionsmodell für intrazelluläre Bakterien, dessen induzierte Immunantworten ebenfalls gut charakterisiert sind. Viele Studien haben gezeigt, dass LLO und p60 protektive Antigene im Listeriose-Mausmodell darstellen. In der vorliegenden Arbeit war es wichtig, dass nach der Immunisierung mit attenuierten Salmonellen Schutzexperimente durchgeführt werden konnten. Da rekombinante Salmonellen verwendet wurden, die ein Listerien-Epitop exprimieren, konnte die Immunität mit Listerien-Infektionen überprüft werden.

Zielsetzung

Neue Erkenntnisse über die Pathogenitätsmechanismen von *S. typhimurium* haben gezeigt, dass SPI1- und SPI2-Effektorproteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten der *Salmonella*-Infektion exprimiert, und über das T3SS transloziert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob diese zeitlich unterschiedliche Translokation der Fusionsproteine Einfluss auf die Induktion der CD8⁺ T-Zellantwort in oral immunisierten Mäusen hat. Hierfür wurden jeweils ein SPI1- und SPI2-Effektorprotein von *S. typhimurium* als Trägerprotein für das heterologe Antigen p60 ausgewählt. Als SPI1-Effektorprotein wurde das SopE2 verwendet, das zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion exprimiert und transloziert wird. Als spätes SPI2-Effektorprotein wurde das SspH2 ausgewählt. Somit war ein Vergleich der sequentiellen Translokation der beiden Fusionsproteine SopE2/p60 und SspH2/p60 möglich.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Führt die sequentielle Translokation der heterologen Antigene zu einer antigenspezifischen (p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen) CD8⁺ T-Zellantwort im Mausmodell?
2. Können p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen im oralen Mausmodell Schutz vor intrazellulären Bakterien vermitteln?
3. Kommt es aufgrund der verschiedenen Zeitpunkte und unterschiedlich langen Zeiträume der Antigenexpression zu Unterschieden in der Quantität und Qualität (funktionelle Eigenschaften) der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen?
4. Ist mit *S. typhimurium* als Lebendvakzine eine Induktion von langlebigen und proliferationsfähigen Gedächtniszellen (Effektorgedächtniszellen T_{EM} und zentrale Gedächtniszellen T_{ZM}) möglich?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Zentrifuge (5810R)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (5417R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Super T21)	Sorvall, Thermo Electron, Langenselbold
Durchflusszytometer Cyan	Dako Cytomation, Freiburg
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Inkubator BBD	Heraeus, Thermo Electron, Langenselbold
Gelelektrophorese-Kammer	BioRad, München
Spektralphotometer	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, USA
Schwingmühle (MM2000)	Retsch, Haan
Speedvac DNA120	Savant, Thermo Electron, Langenselbold
Tank-Blot-Kammer	BioRad, München

2.2 Chemikalien und Biochemikalien

APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BHI	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BrdU	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	PAN, Aidenbach
CFSE	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cytofix/ Cytoperm	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA
CytopermPlusPuffer	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA
DNase I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS	PAN, Aidenbach
Gentamicin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
GolgiPlug TM (Brefeldin A)	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA
Heparin-Natrium	ratiopharm, Ulm
Kodak X-Omat Röntgenfilme	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Kollagenase VIII	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PermWash	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA
PFA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protogel	national diagnostics, Atlanta, USA
(30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid)	
RPMI 1640	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
SDS	Serva
SeeBluePlus2 Proteinmarker	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin-PE	Invitrogen, Paisley, U.K.
Tris	MP, Ohio, USA
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
WestPico Luminol/Enhancer	Pierce, Sankt Augustin
WestPico Stable Peroxid	Pierce, Sankt Augustin
<i>Yeast</i> -Extrakt (Hefe-Extrakt)	MP, Ohio, USA

2.3 Transfermembranen

Nitrocellulose-Membran (Protran, BA85)	Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel
Gel-Blotting Papier	Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel

2.4 Verbrauchsmaterialien

Zellsiebe (70 µm)	BD Falcon TM , BDBiosciences, Belgien
Nylonfilter (50 µm)	Hartenstein, Würzburg
Einmalspritzen (10 ml)	Braun, Melsungen
Plastik-Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
24-Lochplatten	BD Falcon TM , BDBiosciences, Belgien
96-Lochplatten	Hartenstein, Würzburg
FACS-Röhrchen 1,2 ml	Alpha, Hampshire, UK
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	BD Falcon TM , BDBiosciences, Belgien

2.5 Peptide

Die Peptide wurden von der Firma Jerini (Berlin) synthetisiert:

p60₂₁₇₋₂₂₅ (KYGVSVQDI)

LLO₉₁₋₉₉ (GYKDGNEYI)

2.6 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität (Anti-Maus-)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD4	PerCP		BDPharmingen, San Diego, USA
CD8 α	FITC	53-6.7	BDPharmingen, San Diego, USA
CD8 α	PE	53-6.7	BDPharmingen, San Diego, USA
CD8 α	APC	53-6.7	BDPharmingen, San Diego, USA
CD8 α	Alexa405		eBioscience, San Diego, USA
CD62L	FITC	MEL-14	BDPharmingen, San Diego, USA
CD62L	APC	MEL-14	BDPharmingen, San Diego, USA
CD62L	PE-Cy7		eBioscience, San Diego, USA
CD127	APC	A7R34	eBioscience, San Diego, USA
IL-2	FITC	JES6-5H4	BDPharmingen, San Diego, USA
IFN γ	FITC	XMG1.2	BDPharmingen, San Diego, USA
IgG ₁ Isotyp Kontrolle Immunglobulin	FITC	R3-34	BDPharmingen, San Diego, USA
Fcy III/II Rezeptor (CD16/CD32)		2.4G2	BDPharmingen, San Diego, USA

Das Tetramer H2-K^d #45/ β_2 M/p60₂₁₇₋₂₂₅PE wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von D.H. Busch (TU München) hergestellt und zur Verfügung gestellt.

Verwendete monoklonale Antikörper aus der Maus für den Immunoblot:

anti-M45 von Genovac

Ziege-anti-Maus IgG Peroxidase-gekoppelt Pierce

2.7 Bakterien und Plasmide

2.7.1 Bakterienstämme

Listeria monocytogenes 10403s

Wildtypstamm

Listeria monocytogenes p60 217Ser (Austausch von Lysin in Serin bei AS 217)

Mutantenstamm (Sijts *et al.*, 1997)

2.7.2 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Klonierungen hierfür wurden in der Arbeitsgruppe H. Rüssmann (LMU München) durchgeführt.

Tabelle 2: Relevante Eigenschaften der verwendeten Plasmide

Plasmid	Promotor	Plasmid- kodiertes Protein
pHR 241, pWSK	<i>lac</i> (konstitutiv in <i>Salmonella</i>)	SycE, YopE ₁₋₁₃₈ /p60 ₁₃₀₋₄₇₇ /M45
pHR 261, pBAD	<i>sopE2</i>	SopE ₂₁₋₂₄₀ / p60 ₁₃₀₋₄₇₇ /M45
pHR 281, pBAD	<i>sspH2</i>	SspH ₂₁₋₂₁₄ / p60 ₁₃₀₋₄₇₇ /M45

pWSK29 ist ein Vektor der niedrige Kopienzahlen generiert.

pBAD24 ist ein Vektor der mittlere Kopienzahlen generiert.

Das M45-Tag erlaubt die Detektion des exprimierten Proteins im Immunoblot.

Die verwendeten Plasmide wurden in den *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Stamm SB824 transformiert. SB824 wurde generiert durch Einführung der Mutation *sptP:kan* aus dem Stamm SB237 in den Δ *aroA*-Stamm SL326 (Hoiseh and Stocker, 1981).

2.8 Mausstamm

BALB/c (Harlan/ Winkelmann, Horst, Niederlande)

Hierbei handelt es sich um einen Inzuchtstamm, d.h. jedes Tier ist nahezu homozygot und die Tiere haben demnach ein identisches genetisches Material mit Ausnahme einzelner spontaner Mutationen. Inzuchtmäuse bieten daher einen definierten und konstanten genetischen Hintergrund für *in vivo* Analysen. Die BALB/c Maus wurde 1923 von McDowell gezüchtet und durch Kreuzungen über mehrere Generationen als Inzuchtstamm etabliert. Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2K^d. Für diese Arbeit wurden ausschließlich BALB/c Mäuse verwendet. Alle Mäuse wurden in dem Tierstall des Max von Pettenkofer-Instituts in München gehalten, die beschriebenen Experimente wurden mit 6 - 8 Wochen alten BALB/c Mäusen durchgeführt.

2.9 Pufferlösungen und Medien

Feinchemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Fluka, Sigma, Merck oder Roth in Analysenqualität (p.a.) bezogen.

ACT (Ammoniumchlorid-Tris-Puffer)

0,15 M NH₄Cl
0,17M Tris/HCl
pH 7,4

FACS-Puffer (in 1l PBS)

0,5% (M/V) BSA
0,02% (V/V) NaN₃
pH 8,0

T-Zellmedium

RPMI 1640
10%(V/V) FCS
1% (V/V) Penicillin (10000 U/ml)
1% (V/V) Streptomycin (10 mg/ml)

LB-Flüssigmedium (1l)

10g Trypton
5g NaCl
5g *Yeast*-Extrakt
pH 7,5

LB-Flüssigmedium 0,3M (1l)

10g Trypton
17,53g NaCl
5g *Yeast*-Extrakt
pH 7,5

BHI-Flüssigmedium (1l)

52g BHI

2.9.1 Puffer und Gele für SDS-PAGE1x Laemmli (Laufpuffer)

2 M Glycin
250 mM Tris-Base
1% (M/V) SDS

SDS-Probenpuffer

50 mM Tris/HCl, pH 6,8
100 mM DTT
2% (M/V) SDS
0,1% (M/V) Bromphenolblau
10% (V/V) Glycerin

Transferpuffer für Westernblots

190 mM Glycin
25 mM Tris-Base
0,1% (M/V) SDS
20% (V/V) Methanol
pH 8,3

4x Tris/HCl pH 8,8

1,5 M Tris/HCl
0,4 % (M/V) SDS
pH 8,8

4x Tris/HCl pH 6,8

0,5 M Tris/HCl
0,4 % (M/V) SDS
pH 6,8

Sammelgel

2,2 ml	dH ₂ O
630 µl	Protogel
940 µl	4x Tris/HCL pH 6,8
25 µl	10% APS
5 µl	TEMED

Trenngel

3,1 ml	dH ₂ O
2,5 ml	Protogel
1,9 ml	4x Tris/HCL pH 8,8
50 µl	10% APS
5 µl	TEMED

2.9.2 Puffer für LungenpräparationPuffer 1

500 ml	HBSS
190 mg	EDTA

Kollagenase-Puffer 2

500 ml	RPMI 1640
100 mg	MgCl ₂
73 mg	CaCl ₂
5 % (V/V)	FCS
3 mg	Kollagenase VIII (150U/ml)

Puffer 3

50 ml	PBS
5 % (V/V)	FCS

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Anzucht von *S. typhimurium*

Für die Anzucht von *S. typhimurium* wurde zunächst eine Übernachtskultur angesetzt. Hierfür wurden 3 ml LB^{Amp+}-Flüssigmedium (100 µg/ml Ampicillin als Selektionsmarker) mit einem Tropfen aus der Stammkultur (-70°C) angeimpft. Die Übernachtskultur wurde bei 37°C mit 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 - 30 ml 0,3M LB^{Amp+}-Flüssigmedium mit einer 1:50 Verdünnung aus der Übernachtskultur angeimpft und weiterhin bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Bakterienkultur wurde mittels optischer Dichtemessung bei 600 nm (OD₆₀₀) kontrolliert. Zur Kultur auf festem Medium wurden LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Stammhaltung wird in 1 ml LB-Medium mit 20% Glycerin bei -70°C gelagert.

2.10.2 Präparation der Expressionsproteine von *S. typhimurium*

Für die Expression der Fusionsproteine YopE/p60/M45, SopE2/p60/M45 und SspH2/p60/M45 wurden die jeweiligen *Salmonella*-Stämme (siehe Tabelle 2) wie beschrieben angezüchtet. Die Bakterien wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,7 mittels Zentrifugation bei 4°C mit 5000 rpm für 10 min vom Medium abgetrennt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Der Überstand wurde über einen Filter in ein Reaktionsgefäß überführt, 1 ml Trichloressigsäure (TCA) hinzugegeben und gut vermischt. Das Bakterienzellysate in Form des Pellets wurde in 1 ml PBS (pH 7,4) resuspendiert und bei 4°C mit 14000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienzellysate in 500 µl 1 x Laemmli-Puffer resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Mischung aus Überstand und Aceton wurde für mind. 2 h auf Eis stehen gelassen. Darauf erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C mit 10 000 rpm für 30 min, der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Hilfe eines Zellschabers in 1 ml PBS (pH 7,4) resuspendiert und in 4 ml kaltes (-20°C) Aceton aufgenommen. Dieses Gemisch wurde für 15 min auf Eis inkubiert, dann erfolgte eine weitere Zentrifugation für 30 min bei 4°C, 10 000 rpm. Das so erhaltene Pellet wurde in 1 ml Aceton resuspendiert und in neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine wiederholte Zentrifugation bei 4°C, 14 000 rpm für 3 min. Danach wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet in einer Speedvac getrocknet und dann in 100 µl 50 mM Tris (pH 8,0) resuspendiert. Die Auftrennung der exprimierten Hybridproteine YopE/p60/M45, SopE2/p60/M45 und SspH2/p60/M45 erfolgte mit SDS-PAGE. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im

Immunoblot mit anti-M45, einem monoklonalen Antikörper der gegen die Fusionsproteine gerichtet ist, detektiert.

2.10.3 Nachweis der Translokation von p60-Fusionsproteinen

Die Fähigkeit rekombinanter Salmonellen, YopE-, SopE2- oder SspH2-Fusionsproteine in das Zytosol von Wirtszellen zu translozieren, wurde mit Hilfe von P388D₁-Zellen (Makrophagen-ähnliche Zellen der Maus) untersucht. Dazu wurden P388D₁-Zellen in Petrischalen (100 mm) ausgesät und bis zu einer Dichte von 70% in DMEM-Medium herangezüchtet. Die jeweiligen *Salmonella*-Stämme wurden wie beschrieben angezüchtet.

Das DMEM-Medium wurde 1 h vor Zugabe der Bakterien auf die Zellen entfernt und durch HBSS ersetzt. Danach wurden die P388D₁-Zellen für 90 min mit den *S. typhimurium* SB824-Stämmen infiziert, die jeweils ein YopE-, SopE2- oder SspH2-Fusionsprotein exprimieren (mit einer *multiplicity of infection* MOI von 10 Bakterien/Zelle). Anschließend wurden die infizierten Makrophagen dreimal mit HBSS gewaschen. Es folgte eine weitere Inkubation für 30 min mit DMEM, das mit Gentamicin (50 µg/ml) versetzt war, um extrazelluläre Salmonellen abzutöten. Biochemische Fraktionierungen wurden 2 h, 6 h und 24 h nach der *Salmonella*-Infektion durchgeführt. Dazu wurden die Makrophagen zunächst mit Proteinase K (30 µg/ml) in HBSS für 15 min behandelt, um extrazelluläre Proteine zu eliminieren. Anschließend wurden 3 ml HBSS, welches 2 mM PMSF enthielt, dazugegeben, um die Wirkung der Proteinase K aufzuheben. Die während der Proteinase K-Behandlung sich ablösenden P388D₁-Zellen wurden für 10 min bei 600 rpm zentrifugiert und in 1 ml HBSS, welches mit 0,1% Triton X-100 und 1 mM PMSF versetzt war, lysiert. Das Zelllysat wurde dann für 10 min bei 10 000 rpm zentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert (Triton X-100 unlösliche Fraktion). Der Überstand wurde mittels 0,45µm-Filter steriltfiltriert und die vorhandenen Proteine mit 10% TCA präzipitiert (Triton X-100 lösliche Fraktion). Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

2.10.4 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient zur Trennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichtes in einem elektrischen Feld. Das Monomer Acrylamid, TEMED (N,N,N'-Tetramethylethyldiamid) und Ammoniumpersulfat (APS) werden durch die Zugabe von Bisacrylamid miteinander quervernetzt. Der Vernetzungsgrad des Gels ist dabei abhängig von dem Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid. SDS, welches dem Gel und dem Probenpuffer zugesetzt wird,

bindet an die Polypeptidketten der Proteine und führt zu einer negativen Nettoladung der Proteine. Das Kochen der Proteinproben bei 90 °C führt zur Konformationsauflösung, so dass die Proteine in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld zur Anode wandern.

Das Gel setzt sich aus dem Trenngel, in dem die Proteine gemäß ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden, und dem Sammelgel, in welchem sich die Geltaschen zur Ladung der Proteinproben befinden und welches eine Konzentrierung der Proben an der Grenze zum Trenngel ermöglicht, zusammen. Als Standard wurden 10%-ige Trenngele und 5%-ige Sammelgele aus einer 30% (V/V) Acrylamidstammlösung benutzt.

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und anschließend mit H₂O-gesättigtem-Isobutanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isobutanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und mit einem Taschenkamm versehen.

Nach Entfernen des Kammes wurden die Geltaschen mit H₂O ausgespült, um Acrylamidreste zu beseitigen, dann wurde das Gel in eine Gelkammer von BioRad eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit mindestens 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 90°C denaturiert. Der Gel-Lauf erfolgte in 1 x Laemmli-Puffer bei einer konstanten Spannung von 200 V für 45 min. Die Verwendung von Proteinmarkern ermöglicht nach Färbung des Gels bzw. des Immunoblots eine Zuordnung der Banden entsprechend ihres Molekulargewichtes.

2.10.5 Immunoblot

Beim Immunoblot (*Western Blot*) werden Proteine, die zuvor im SDS-Gel aufgetrennt wurden, in einem elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Transfermembran übertragen und immobilisiert. Gel und Transfermembran wurden vor dem Blotten für kurze Zeit in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden Gel und Membran luftblasenfrei zwischen zwei Transferpuffer-getränkte Schwämme und zwei Lagen Gel-Blot-Papier gelegt. Mit Hilfe von Plastikhalterungen wurde der Aufbau in eine Tankblot-Kammer eingesetzt die mit Western-Transfer-Puffer gefüllt wurde. Der Proteintransfer fand für 1 h bei 90V statt. Der Stromfluss erfolgte dabei von der Kathode durch das Gel und die Membran zur Anode. Die so immobilisierten Proteine konnten dann mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert werden.

Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 5 % (M/V) Milchpulver in PBS bei RT für 1 h inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem ersten Antikörper, einem monoklonalen Antikörper (anti-M45) gegen die *Salmonella-*

Fusionsproteine gerichtet, erfolgte über Nacht bei 4°C. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 10 min bei RT mit Waschpuffer (PBS mit 0,5 % (M/V) Milchpulver) entfernt. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h mit einem sekundären Antikörper inkubiert, der gegen den primären Antikörper gerichtet war. Alle Antikörper wurden in 0,5% (M/V) Milchpulver in PBS verdünnt (1:5000).

Nachweis mittels Peroxidase-gekoppelter Antikörper

Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran zweimal für 10 min mit 0,5% (M/V) Milchpulver in PBS gewaschen. Der letzte Waschschritt erfolgte ausschließlich mit PBS. Die Aktivierung der *horse radish-peroxidase* (HRP, Peroxidase) erfolgte durch Inkubation in einem 1:1 Gemisch einer Chemilumineszenz-Lösung (WestPico Luminol/Enhancer und WestPico Stable Peroxid) für ca. 2 min. Anschließend wurde ein Röntgenfilm auf die mit Plastikfolie bedeckte Membran aufgelegt, für 5 - 30 min exponiert, entwickelt und fixiert.

2.11 Immunologische Methoden

2.11.1 Orale Immunisierung mit *S. typhimurium*

Hierfür wurden die *Salmonella*-Stämme SB824(pHR241), SB824(pHR261) und SB824(pHR281) wie beschrieben (2.1.1) angezüchtet. Nach Überimpfen der Übernachtskultur wurde das 0,3M LB^{Amp⁺}-Flüssigmedium verwendet, um die Expression der Effektorproteine des auf der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 (SPI1) codierten Typ III-Sekretionssystems anzuschalten. Nach Wachstum der *Salmonella*-Kulturen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8, wurden die Bakterien mittels Zentrifugation bei RT mit 4000 rpm für 12 min vom Medium abgetrennt. Die Bakterienzellzahl pro 100 µl wurde mit Hilfe der gemessenen OD-Standardkurve von *S. typhimurium* ermittelt.

S. typhimurium: OD₆₀₀ 0,1 = 2,5 x 10⁸ Bakterien/ ml

Etwa 4 h vor Immunisierung der Mäuse wurden Futter und Wasser entfernt, dann wurden die Mäuse mit Hilfe einer Schlundsonde mit 5 x 10⁸ Bakterien/ 50 µl immunisiert, und anschließend wieder mit Futter und Wasser versorgt.

2.11.2 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

5 ml BHI-Medium wurden mit 20 μ l der Glycerinkultur von *Listeria monocytogenes* 10403s Wildtypstamm bzw. mit 40 μ l der Glycerinkultur von *Listeria monocytogenes* p60 217Ser angeimpft. Hatten die Bakterien eine OD₆₀₀ von 0,05 - 0,1 erreicht, wurde die Listerienzellzahl mit folgender Formel bestimmt.

Listeria monocytogenes 10403s: OD₆₀₀ 0,1 = 1×10^8 Bakterien/ ml

Listeria monocytogenes p60 217Ser: OD₆₀₀ 0,1 = 8×10^8 Bakterien/ ml

Für eine Erstinfektion wurde den Mäusen intravenös (iv) in die Schwanzvene 1×10^3 / 100 μ l Bakterien gespritzt, für einen Protektionsversuch wurden die Mäuse iv mit 3×10^4 / 100 μ l Bakterien (subletale Dosis) oder mit 2×10^5 /100 μ l Bakterien (letale Dosis) infiziert.

2.11.3 Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut

Für die Blutabnahme wurden die Mäuse unter einer Infrarotlampe erwärmt. Dies führt zu einer Vasodilatation und somit zur Förderung der Durchblutung. Durch Einstechen einer Kanüle in die Schwanzvene wurden der Maus etwa 100 μ l Blut entnommen. Das Blut wurde in 10 μ l Heparin-Natrium (5000 I.E./ 0,2 ml) aufgenommen, um die Blutgerinnung zu verhindern. Zur Lyse der Erythrozyten wurden 10 ml ACT dem Blut hinzugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Blut mit 1500 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet nochmals mit PBS gewaschen (1500 rpm, 5 min, RT).

2.11.4 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Mäuse getötet, äußerlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert. Die Organentnahme erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten, entweder 2, 4 oder 6 Wochen nach Immunisierung. Die Lymphknoten (axilläre, submandibuläre, inguinale, mesenteriale) wurden mit rundgebogenen Pinzetten entnommen und in RPMI1640-Medium bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Milz wurde mit Hilfe einer Schere herausgelöst und ebenfalls in RPMI1640-Medium gelagert. Zur Präparation der Lunge wurde die *Vena cava* durchtrennt, um die Maus zu entbluten. Anschließend wurde ein Heparin-Natrium/ PBS-Gemisch (75 U/ml) zum Spülen der Lunge verwendet. Die Spülung zur Entfernung des peripheren Blutes erfolgte über den rechten Vorhof. Anschließend wurde die Lunge mit einer Schere herausgelöst und sofort weiterverarbeitet.

2.11.4.1 Verarbeitung von Milz und Lymphknoten

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden Milz und Lymphknoten mit dem Stempel einer Injektionsspritze über einem Zellsieb zerkleinert und erneut in RPMI1640-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann 7 min bei 4°C mit 1500 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet einer Erythrozytenlyse mit 5 ml ACT (7 min, RT) unterzogen. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 5 ml RPMI1640-Medium verdünnt und bei 1500 rpm 7 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml RPMI1640-Medium aufgenommen, die Zellen gezählt und gefärbt.

Zur Homogenisierung der Milz wurde diese in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit einer Metallkugel gegeben. Das Gefäß wurde in die Vorrichtung der Schwingmühle (Homogenisator) eingespannt und die Milz 5 min bei Amplitude 80 zerkleinert. Diese Homogenisierung führt zu einer Zerstörung der Zellen wodurch die Listerien freigesetzt werden konnten.

2.11.4.2 Verarbeitung der Lunge

Nach Entnahme der Lunge wurde diese mit einem Skalpell zerkleinert und in einen Puffer mit EDTA gegeben, um die Lymphozyten aus dem Lungengewebe zu lösen. In diesem Puffer wurde die Lunge 30 min bei RT gerührt, danach wurde das Lungengewebe mit einem FCS-haltigen Puffer gespült und in ein Gefäß mit 3 ml Kollagenase-Puffer überführt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C sollten die Kollagenfasern verdaut sein und die Lymphozyten frei zugänglich. Anschließend wurde diese Lymphozytensuspension gespült und in 2 ml RPMI1640-Medium überführt. Die Zellen wurden gezählt und gefärbt.

2.11.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierfür wurden die Zellen 1:20 verdünnt, 10 µl der Zellen wurden mit 90 µl PBS und 100 µl Trypanblau-Lösung gemischt. Dann wurden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und zwei Quadrate mit einem Volumen von 0,1 mm³ ausgezählt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel ermittelt: Mittelwert der beiden Quadrate x Verdünnungsfaktor x 10⁴.

2.11.6 ELISPOT-Assay

Hierfür wurde eine spezielle 96-Lochplatte (ELISPOT-Platte), deren Boden aus einer Nitrozellulose-Membran besteht, mit dem monoklonalen Antikörper (Endkonzentration 10 µg/ml) gegen IFN- γ beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. In einer Rundboden-Mikrotiterplatte wurden unseparierte Milzzellen (6×10^5 / Rundboden) der immunisierten Mäuse für 6 h in Gegenwart von 10^{-8} M des synthetischen Nonamer-Peptids p60₂₁₇₋₂₂₅ stimuliert. Diese aktivierten Zellen wurden auf die ELISPOT-Platte transferiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Anfärbung der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erfolgte mit einem anti-Maus IFN- γ Antikörper und dem Peroxidase-konjugiertem Streptavidin. Zur Entwicklung der Farbreaktion diente AEC. Die Anzahl der antigenspezifischen Zellen ließ sich durch die Zahl der roten *spots* (Punkte) errechnen. Spezifität und Sensitivität des ELISPOT-Tests wurde kontrolliert durch IFN- γ -sekretierende CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch sind für p60.

2.11.7 Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern

Die Färbungen wurden in einer 96-Lochplatte durchgeführt. Zuerst wurden die aufbereiteten Zellen aus den jeweiligen Organen mit 50 µl anti-CD16/CD32 (Fc-Block) (1:100) und EMA (1:1000, 20 min, auf Eis, im Licht), inkubiert, um den Fc γ -Rezeptor zu blockieren und um eine Lebend-Tod Diskriminierung zu erhalten. Die Zellen wurden dann mit 150 µl FACS Puffer gewaschen. Die Oberflächen-Antikörper wurden in kaltem FACS Puffer verdünnt und in 50 µl Volumen zu den Zellen gegeben, gut gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Proben wurden dann in 1% PFA fixiert und bei 4°C im Dunkeln gelagert bis zur Analyse am FACSCalibur.

2.11.7.1 Tetramerfärbung

Für die Tetramerfärbung wurden 6×10^6 Zellen pro Färbeansatz verwendet. Hierfür wurde das Tetramer zusammen mit den Oberflächenmarkern im FACS Puffer 1:50 verdünnt und für 1 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

2.11.7.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Die Milzzellen wurden wie oben beschrieben präpariert. Zur Restimulierung der Zellen wurden 1×10^7 Zellen / ml in einer 24-Lochplatte verteilt und mit $1 \mu\text{g/ml}$ Peptid (synthetisches Nonamer-Peptid p60₂₁₇₋₂₂₅) restimuliert und für 5 h bei 37°C inkubiert. Nach 2 h wurde $1 \mu\text{g/ml}$ GolgiPlugTM (enthält Brefeldin A) hinzugegeben. Brefeldin A inhibiert den intrazellulären Proteintransport, so dass die Zytokine nicht nach außen transportiert werden können und sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat ansammeln. Nach 5 h Inkubation wurden die Zellen aus der 24-Lochplatte in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 4°C mit 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in eine 96-Lochplatte pipettiert und wie beschrieben die Färbung mit Fc-Block, EMA und den Oberflächen-Antikörpern durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit 100 ml Cytofix/Cytoperm behandelt, um die Zellwand zu permeabilisieren (20 min, auf Eis, im Dunkeln) und die Oberflächenmarkierung zu fixieren. Anschließend wurden die Zellen mit PermWash-Puffer (enthält Saponin) gewaschen und danach die intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt. Hierfür wurde der IFN- γ -Antikörper (1:500) in $50 \mu\text{l}$ PermWash-Puffer verdünnt, auf die Zellen pipettiert und inkubiert (30 min, auf Eis, im Dunkeln). Der PermWash-Puffer wird verwendet, um den permeabilisierten Zustand der Zellwand aufrechtzuerhalten, da die Saponin-vermittelte Permeabilisierung ein reversibler Prozess ist. Parallel wurde eine Färbung mit einer Isotyp-entsprechenden Kontrolle mit irrelevanter Spezifität durchgeführt. Vor der Fixierung der gefärbten Zellen in 1% PFA wurden diese nochmals mit PermWash und FACS-Puffer gewaschen.

2.11.7.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Mit einem FACS-Gerät (fluorescence activated cell sorter, FACS) kann die relative Größe, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Zellen werden dazu 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. Die Fluorochrome mit denen die Zellen gefärbt wurden, absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch sogenannte *Photomultiplier* in elektrische Signale umgewandelt und gibt somit Auskunft über die Anzahl der fluoreszierenden Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität. Bei der Analyse der aufgenommenen Zellen kann die

interessierende Zellpopulation durch Eingrenzen der entsprechenden Region genau betrachtet werden.

Die Messungen erfolgten mit einem FACSCalibur-Durchflusszytometer mit zwei Lasern, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren (488 nm und 633 nm) und mit einem Cyan-Durchflusszytometer mit einem Argon Laser (488 nm), einem roten Diodenlaser (633 nm) und einem UV-Laser (351 nm). Je nach Filtereinsatz können bis zu 10 unterschiedliche Wellenlängen emittieren werden. Die Datenaufnahme erfolgte mit CellQuest Software (BectonDickinson), die Datenanalyse mit FlowJo Software (TreeStar).

2.11.8 BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine)-Färbung

Mit Hilfe von BrdU kann die Proliferation von Zellen *in vivo* untersucht werden, da sich BrdU in die DNA sich teilender Zellen während der S-Phase einbaut. Um die Proliferation von Zellen nach einer Belastungsinfektion mit Listerien *in vivo* zu untersuchen, erhielten immunisierte Mäuse am Tag des Protektionsversuchs (etwa 6 Wochen nach Immunisierung) 3×10^4 *Listeria monocytogenes* 10403s/100 μ l iv und 100 μ l BrdU (10 mg/ml) ip verabreicht, sowie zusätzlich 1 mg/ml BrdU in das Trinkwasser (über fünf Tage). Tag fünf nach Belastungsinfektion wurde die Milz präpariert wie beschrieben und die Zellen (1×10^6 Zellen pro Färbeansatz) gefärbt. Nach Färbung mit Fc-Block, EMA und Oberflächen-Antikörpern sowie Tetramer, wurden die Zellen gewaschen und mit 50 μ l Cytofix/ Cytoperm inkubiert (20 min, auf Eis, im Dunkeln), um die Zellwand zu permeabilisieren und die Oberflächenfärbung zu fixieren. Nach einem weiteren Inkubationsschritt mit 50 μ l CytopermPlusPuffer (10 min, auf Eis im Dunkeln), welcher zur Erhöhung der Permeabilisierung der fixierten Zellen dient, wurden die Zellen erneut mit Cytofix/ Cytoperm behandelt (5 min, auf Eis, im Dunkeln). Anschließend wurden die Zellen mit PermWash gewaschen, um sie für den DNase-Verdau vorzubereiten. Die Zellen wurden mit 300 μ g/ml DNase versetzt (1 h bei 37°C im Dunkeln), um die BrdU-markierte DNA mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper anfärben zu können (30 min, 4°C, im Dunkeln). Nach Waschen der Zellen mit FACS-Puffer wurden die Proben in 1% PFA fixiert.

2.11.9 Listeria-Koloniebestimmung nach Belastungsinfektion

Zu bestimmten Zeitpunkten nach einer Belastungsinfektion wurden die Mäuse getötet, die Milz entfernt und wie beschrieben homogenisiert. Mit dieser Zellsuspension wurden verschiedene Verdünnungsstufen durchgeführt und jeweils 100 μ l dieser Verdünnung auf

einer BHI-Platte ausplattiert. Die Platten wurden 24 h bei 37°C inkubiert und dann die Listerien-Kolonien gezählt.

2.11.10 *In vivo* Zytotoxizitätstest

Dieser Test erlaubt die Messung der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen *in vivo*. Dazu wurden Milzen aus naiven BALB/c-Mäusen (Donormäusen) präpariert wie beschrieben und die Erythrozyten lysiert. Die Zellen wurden gezählt, in T-Zellmedium aufgenommen und in zwei Populationen aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit Peptid beladen, indem der Zellsuspension das p60-Peptid (1 mg/ml) zugefügt wurde. Die Zellen wurden für 45 min bei 37° inkubiert und anschließend mit einer hohen Konzentration CFSE (5 µM) angefärbt (CFSE^{hoch}). Die andere Hälfte der Zellen blieb unbeladen und wurde mit einer niedrigen Konzentration CFSE (0,5 µM) angefärbt (CFSE^{niedrig}). Die CFSE-Färbung wurde bei 37°C für 10 min durchgeführt und durch Zugabe von T-Zellmedium gestoppt. Hierfür wurden die Zellen 5 min auf Eis inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen beider Populationen im Verhältnis 1:1 vermischt, so dass jede Maus etwa 6 x 10⁶ Zellen/ 200 µl iv gespritzt bekam. Die Zellen wurden in BALB/c-Mäuse injiziert, die 6 Wochen zuvor immunisiert worden waren. Nach 5 h wurden die Mäuse geblutet, nach 20 h wurden die Mäuse getötet, um ihre Milz zu isolieren. Das Blut und die präparierten Milzzellen wurden ohne weitere Färbung mittels Durchflusszytometrie analysiert, so dass jede Population durch ihre unterschiedliche CFSE-Fluoreszenzintensität detektiert werden konnte. Um die spezifische Lyse zu berechnen, wurden folgende Formel verwendet:

Verhältnis beider Populationen zueinander

$$r = \text{Prozentsatz CFSE}^{\text{niedrig}} / \text{Prozentsatz CFSE}^{\text{hoch}}$$

Prozentsatz der spezifischen Lyse (sL)

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

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von *Salmonella* SPI1- und SPI2-Hybridproteinen

Die Konstruktion eines Fusionsproteins bestehend aus dem *Yersinia* outer protein E (YopE) und dem Modellantigen p60 (Mureinhydrolase) von *L. monocytogenes* hat gezeigt, dass das chimäre YopE/p60 sowohl sekretiert als auch transloziert werden kann, wenn das YopE die Sekretions- (YopE₁₋₁₈) und/oder Translokationsdomäne (YopE₁₋₁₃₈) enthält (Russmann *et al.*, 2001). Das Hybridprotein YopE₁₋₁₃₈/p60 wird über das *Salmonella*-T3SS direkt in das Zytosol von antigenpräsentierenden Zellen transloziert, so dass im oralen Immunisierungsmodell zur Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort kommt (Igwe *et al.*, 2002; Russmann *et al.*, 2001).

Aufgrund dieser Ergebnisse folgte analog zu YopE die Herstellung von Fusionsproteinen mit *Salmonella*-Effektorproteinen, von denen bekannt ist, dass sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten des mehrwöchigen Infektionsverlaufs exprimiert werden. Durch die Verwendung eines SPI1- bzw. SPI2-Effektorproteins als Trägermolekül für p60 sollte somit eine sequentielle Translokation der Hybridproteine erreicht werden. Die Konstruktion der Fusionsproteine ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Das SPI1-Effektorprotein SopE2 wirkt als Guanin-Nukleotid austauschfaktor für die eukaryontischen Rho-GTPasen und spielt somit eine Rolle bei der frühen Phase der *Salmonella*-Invasion (Fu und Galan, 1999; Kubori und Galan 2003). SopE2 wurde aufgrund seiner kleinen Größe (240 AS) ausgewählt. Da die Sekretions- und Translokationsdomänen von SopE2 nicht exakt charakterisiert sind, wurde das gesamte SopE2-Protein mit p60₁₃₀₋₄₇₇ fusioniert. Das daraus resultierende SopE2₁₋₂₄₀/p60₁₃₀₋₄₇₇-Hybridprotein ist auf einem Plasmid mittlerer Kopienzahl (pHR261) kodiert, unter der Kontrolle des nativen *sopE2*- Promotors. Das SPI2-Effektorprotein SspH2 ist ein Protein mit Leucin-reichen Wiederholungen und ko-lokalisiert mit dem polymerisierenden Aktinzytoskelett (Miao *et al.*, 2003). Für die Klonierung des SspH2-Konstruktes wurde eine verkürzte Variante des SspH2 verwendet, da das Protein mit 788 AS sehr groß ist. Es wurde der N-terminale Abschnitt (AS 1- 214) verwendet, um die Leucin-reiche Region (AS 234-444) zu eliminieren. Die Sekretions- und Translokationsdomänen von SspH2 sind im N-Terminus kodiert (Miao *et al.*, 1999). Der N-Terminus von SspH2 bindet an Filamin. Diese Interaktion ist für die subzelluläre Lokalisation des Typ III-Effektorproteins wichtig (Miao *et al.*, 2003). Das Fusionsprotein SspH2/p60 wurde unter Kontrolle des nativen *sspH2*- Promotors hergestellt, und ebenfalls auf einem Plasmid mit mittlerer Kopienzahl (pHR281) kodiert (Panthel *et al.*, 2005).

Alle konstruierten Fusionsproteine haben am C-terminalen Ende ein 18 AS umfassendes M45-Epitop-, Tag', welches sich vom adenoviralen E4-6/7-Protein ableitet (Abb. 6) (Obert *et al.*, 1994).

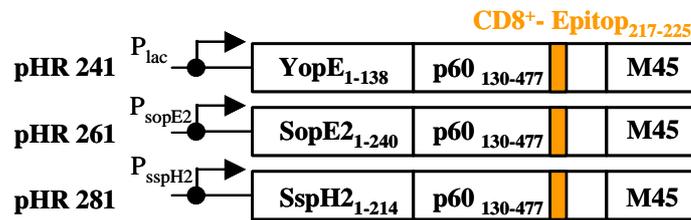


Abbildung 6: Schematische Darstellung der plasmidkodierten Fusionsproteine. Die p60-Fusionsproteine haben am C-terminalen Ende ein M45-, Tag'. Die Größen der Effektorproteine sind so ausgewählt, dass sie sowohl das Sekretions- als auch das Translokationssignal enthalten.

Die Fusionsproteine werden jeweils in dem attenuierten *S. typhimurium*-Stamm SB824 exprimiert. Die Konstrukte SB824(pHR241), SB824(pHR261) und SB824(pHR281) lagen zu Beginn meiner Arbeit vor und wurden von mir für die folgenden Immunisierungsstudien eingesetzt.

3.2 *Salmonella*-T3SS-abhängige Sekretion von p60-Fusionsproteinen

Die Expression und Sekretion der Fusionsproteine SopE2/p60 und SspH2/p60 in den Bakterienüberstand wurde mit Hilfe eines Immunoblots überprüft. Hierfür wurden nach Herstellung eines Bakterienzelllysates und des entsprechenden Überstandes die Proteine in einem 10%igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Fusionsproteine wurden mit Hilfe von anti-M45 und anti-Maus-HRP Antikörpern und anschließender ECL-Entwicklung detektiert, wie in Abbildung 7 dargestellt. Der Vergleich mit der Markerbande zeigt, dass die Fusionsproteine in erwarteter Größe exprimiert werden, 70 kDa für SopE2/p60 und 63 kDa für SspH2/p60. Als Expressionskontrolle diente YopE/p60 mit einer Größe von 58 kDa. Der Blot zeigt deutlich, dass die Fusionsproteine in den Überstand sekretiert werden.

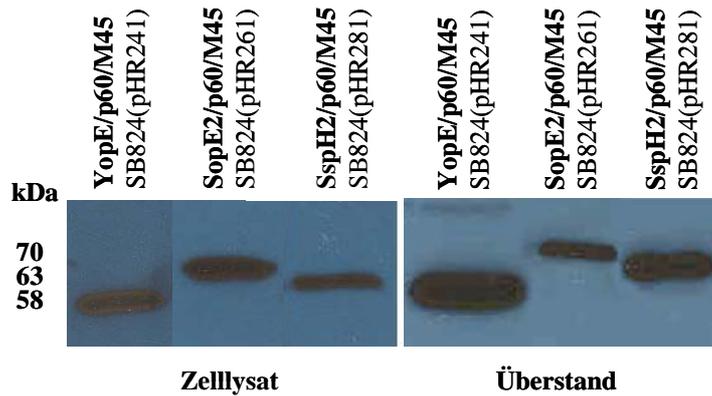


Abbildung 7: Nachweis der Expression und Sekretion von p60-Hybridproteinen durch *S. typhimurium* mittels Immunoblot. Um die exprimierten und sekretierten Proteine aus den Kulturen des jeweiligen rekombinanten *S. typhimurium*-Stammes SB824(pHR241), SB824(pHR261) und SB824(pHR281) nachweisen zu können, wurden das Bakterienpellet und der aufbereitete Überstand mit Ladepuffer versetzt und in einem 10%igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das heterologe p60-Protein wurde im Immunoblot mit anti-M45 mAb detektiert.

3.3 Nachweis der Translokation von p60-Fusionsproteinen

Die Fähigkeit der rekombinanten Salmonellen, die SopE2/p60- und SspH2/p60-Fusionsproteine in das Zytosol von Makrophagen zu translozieren, wurde ebenfalls mittels Immunoblot untersucht (Collazo und Galan, 1997). Es sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit der zeitliche Ablauf der Translokation bzw. die translozierte Antigenmenge der beiden Fusionsproteine variiert. Als chimäres Referenzprotein wurde das YopE/p60- verwendet, welches nachweislich konstitutiv exprimiert und transloziert wird (Russmann *et al.*, 2001). P388D₁-Zellen (Makrophagen-ähnliche murine Zellen) wurden jeweils mit den drei Stämmen SB824(pHR241), SB824(pHR261) und SB824(pHR281) infiziert. Es wurde 2 h, 6 h und 24 h nach Infektion eine biochemische Fraktionierung der P388D₁-Zellen durchgeführt. Diese führte zu einer Triton X-100 unlöslichen Fraktion (Fraktion 1), und einer Triton X-100 löslichen Fraktion (Fraktion 2). Erstere Fraktion enthält die internalisierten Salmonellen, letztere Fraktion besteht aus dem Makrophagen-Zellysat mit den zytosolischen Proteinen. In Abbildung 8 ist zu sehen, dass die Menge des translozierten p60-Fusionsproteins in allen drei rekombinanten Salmonellen-Stämmen vergleichbar ist. Das YopE/p60-Fusionsprotein wurde zu jedem Zeitpunkt effizient exprimiert und transloziert. Ein Maximum des zytosolischen Deponierens war bereits 6 h nach der Infektion zu sehen. Im Gegensatz dazu konnte das SopE2/p60-Fusionsprotein nur nach 2 h und 6 h detektiert werden, eine Expression und Translokation zu einem späteren Zeitpunkt (24 h) fand nicht mehr statt. Dies weist darauf hin, dass nach einer erfolgreichen Invasion von *Salmonella* in die Wirtszelle die SPII-Proteine nicht mehr exprimiert werden. Die Expression und Translokation des

SspH2/p60-Fusionsproteins hingegen konnte erst 6 h nach der Infektion beobachtet werden, und erreichte ihr Maximum 24 h nach der Infektion. Diese späte Expression von SspH2/p60 reflektiert die Funktion des SPI2-Gens, das erst zu einem Zeitpunkt aktiviert wird, wenn die Invasion der Salmonellen in die Wirtszelle erfolgreich war.

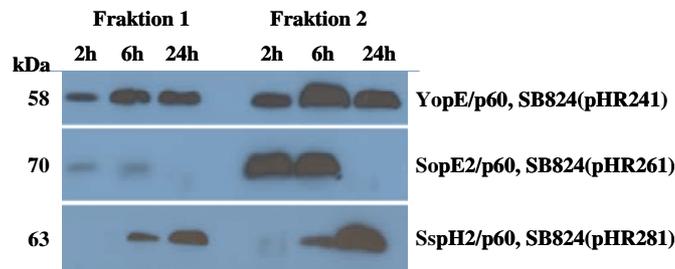


Abbildung 8: Nachweis der sequentiellen Translokation des p60-Fusionsproteins mittels Immunoblot. P388D₁-Makrophagen wurden entweder mit SB824(pHR241), SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) infiziert. Die biochemischen Fraktionierungen wurden 2 h, 6 h und 24 h nach der Infektion durchgeführt. Fraktion 1: Triton X-100 unlösliche Fraktion der intrazellulären Salmonellen, Fraktion 2: Triton X-100 lösliche Fraktion des Makrophagen-Zellysates mit löslichen Proteinen. Die beiden Fraktionen wurden in einem 10%igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das heterologe p60-Protein wurde im Immunoblot mit anti-M45 mAb detektiert.

Es konnte somit deutlich gezeigt werden, dass eine sequentielle Translokation von p60-Hybridproteinen durch eine SPI1- bzw. SPI2-abhängige Expression erreicht werden kann.

3.4 Nachweis IFN- γ -sekretierender antigenspezifischer T-Zellen mittels ELISPOT-Assay

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Translokation der p60-Fusionsproteine in das Zytosol von APCs *in vivo* stattfindet und dort zur Aktivierung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen führt. Hierfür wurden zwei Gruppen von Mäusen jeweils oral mit 5×10^8 SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) immunisiert. Zur Kontrolle für eine positive CD8⁺ T-Zellinduktion diente die Immunisierung mit SB824(pHR241) (Rüssmann *et al.*, 2001).

Sechs Wochen nach der Immunisierung wurde mittels ELISPOT-Assay die Anzahl an p60-spezifischen CD8⁺ T-Zellen pro 10^5 Milzzellen bestimmt, die aufgrund der p60-Peptidstimulierung IFN- γ sekretieren. In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass Mäuse, die mit SB824(pHR261) immunisiert wurden, eine hohe Frequenz von p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aufweisen. Die Anzahl der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen in dieser Gruppe war ähnlich hoch wie in der Gruppe der Mäuse, die mit SB824(pHR241) immunisiert worden waren. Mäuse, die mit rekombinanten Salmonellen immunisiert worden waren, die

SspH2/p60 exprimieren, zeigten ebenfalls eine bemerkenswerte Induktion von IFN- γ -sekretierenden antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen.

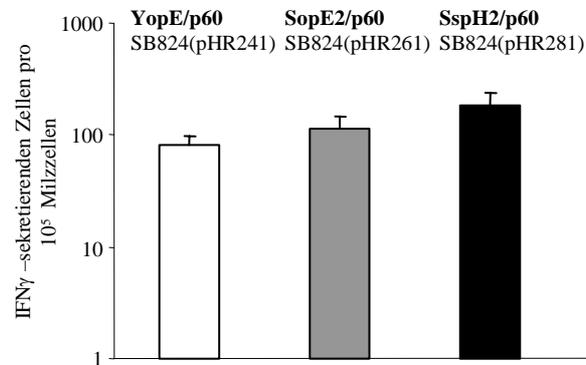


Abbildung 9: Anzahl an IFN- γ -sekretierenden T-Zellen nach Peptidstimulierung. BALB/c Mäuse wurden mit SB824(pHR241), SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) immunisiert. Sechs Wochen nach der Immunisierung wurde die Milz entfernt und präpariert. Die Anzahl der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde mit Hilfe des ELISPOT-Assays bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittliche Verteilung (\pm SD) jeder Immunisierungsgruppe (repräsentativ für je 15 Mäuse).

Dieses Ergebnis zeigt, dass eine orale Immunisierung mit den rekombinanten *S. typhimurium*-Stämmen SB824(pHR241), SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) jeweils zu einer effizienten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellantwort führt. Des Weiteren konnte zwischen den einzelnen Immunisierungsgruppen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der generierten CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden ($P > 0,05$) (Panthel *et al.*, 2005).

3.5 Schutz vor einer *L. monocytogenes*-Infektion nach oraler Immunisierung mit SB824(pHR261) und SB824(pHR281)

Nachdem im ELISPOT gezeigt werden konnte, dass durch die Immunisierung mit SB824(pHR261) und SB824(pHR281) p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert werden, sollte nun untersucht werden, ob die Immunantwort ausreicht, um einen Schutz vor einer Infektion mit *L. monocytogenes* (Wildtyp) zu gewährleisten. *L. monocytogenes* ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium, das in das Zytosol infizierter Wirtszellen unter anderem die Mureinhydrolase p60 freisetzt. Dieses Protein besitzt ein H2K^d-restringiertes immundominantes CD8-Epitop an der Aminosäurestelle 217-225. Das heißt, die durch die Immunisierung generierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen könnten in der Lage sein, Schutz gegenüber einer *L. monocytogenes*-Infektion zu verleihen.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden Mäuse sechs Wochen nach der Immunisierung mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) mit einer letalen *L. monocytogenes*-Dosis von 2×10^5 (= $10 \times \text{LD}_{50}$) infiziert. Zwei Tage nach der Belastungsinfektion wurden die Milzen homogenisiert und die kolonie-bildenden Einheiten (KBE) der überlebenden Listerien bestimmt (Abbildung 10).

Die Kontrollgruppe, die mit einer subletalen *L. monocytogenes*-Dosis immunisiert worden war (immune Kontrollgruppe), zeigte erwartungsgemäß Schutz gegenüber der Listerien-Belastungsinfektion. Es konnten nur wenige überlebende Bakterien in den Milzen nachgewiesen werden (≤ 200 Bakterien/Milz). Die naiven Mäuse hingegen waren vollkommen ungeschützt gegenüber der Listerien-Infektion und hatten eine sehr hohe Anzahl an KBE in den Milzen ($> 4 \times 10^7$ Bakterien/Milz). Die mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) immunisierten Mäuse wiesen einen sehr großen Unterschied in ihrem Schutz auf. Die Gruppe der Mäuse, die mit SB824(pHR261) immunisiert worden waren, zeigte eine vergleichbare Bakterienbelastung wie die naiven Mäuse ($\cong 1 \times 10^7$ Bakterien/Milz), d.h. diese Tiere waren nicht geschützt. Die Mäuse, die mit den rekombinanten Salmonellen immunisiert worden waren, die das Fusionsprotein SspH2/p60 exprimieren, wiesen dagegen einen effizienten Schutz auf. Es waren nur $\cong 400$ Listerien/ Milz nachweisbar, d.h. es wurde etwa die gleiche Anzahl an Listerien wie in der immunen Kontrollgruppe gefunden.

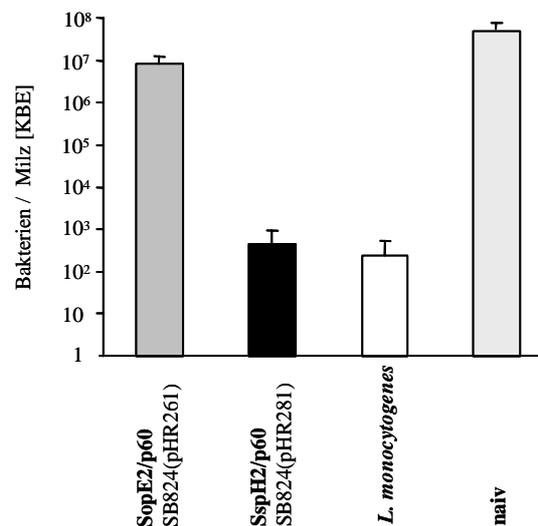


Abbildung 10: Schutz nach Infektion mit letaler *L. monocytogenes*-Dosis. BALB/c Mäuse wurden oral mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) immunisiert. Die Kontrollgruppe wurde primär mit einer subletalen *Listeria*-Dosis infiziert ($0,1 \times \text{LD}_{50}$). Sechs Wochen nach der Immunisierung wurden alle Gruppen einer letalen *Listeria*-Dosis ausgesetzt ($10 \times \text{LD}_{50}$). Naive Mäuse dienten als Kontrolle für die Infektion. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und die Anzahl lebender Listerien in der Milz bestimmt ($n = 4$ Mäuse / Gruppe). Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für mindestens vier ähnliche Versuche.

Diese Daten warfen die Frage auf, ob der induzierte Immunschutz vor einer *Listeria*-Infektion durch die Generierung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen gewährleistet wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein Protektionsversuch mit einer Listerien-Mutante durchgeführt.

3.6 Rolle der CD8⁺ T-Zellen beim Schutz vor einer *L. monocytogenes*-Infektion nach oraler Immunisierung

Die Daten des letalen Protektionsexperimentes wiesen einen signifikanten Unterschied zwischen der Immunisierung mit SB824(pHR261) und SB824(pHR281), nachfolgend auch als Gruppe 1 und 2 bezeichnet, auf. Um auszuschließen, dass dieser Schutz eventuell nicht durch die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen vermittelt wird, wurde eine erneute Belastungsinfektion durchgeführt. Hierfür wurde der *L. monocytogenes*-Mutantenstamm p60 217Ser (im Folgenden *List* 217Ser genannt) verwendet. *List* 217Ser hat einen AS-Austausch in dem immundominanten Epitop von p60 (AS217: Lysin → Serin), so dass p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen keinen Schutz vor einer Infektion mit diesem Stamm vermitteln können (Sijts *et al.*, 1997).

Sechs Wochen nach der oralen Immunisierung mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) wurden die Mäuse mit einer letalen Dosis von *List* 217Ser (10 x LD₅₀) infiziert. Zwei Tage nach der letalen Belastungsinfektion wurden die Milzen entnommen, homogenisiert und auf das Vorhandensein von lebenden Listerien getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 dargestellt.

Die Kontrollgruppe, die mit einer subletalen *L. monocytogenes*-Dosis infiziert wurde, zeigte erwartungsgemäß Schutz gegenüber der Listerien-Belastungsinfektion, da sie nicht nur gegen das immundominante p60-Epitop, sondern auch gegen das LLO-Epitop (Listeriolysin O, immundominantes Epitop AS 91-99) CD8⁺ T-Zellen generiert. Es konnten kaum überlebende Bakterien in den Milzen nachgewiesen werden (≤ 100 Bakterien/Milz). Die naiven Mäuse hingegen waren vollkommen ungeschützt gegenüber der Listerien-Infektion und hatten eine sehr hohe Anzahl an KBE in den Milzen ($\cong 2 \times 10^7$ Bakterien/Milz). Die Anzahl lebender Listerien in Gruppe 1 war ähnlich hoch wie in der Gruppe der naiven Mäuse. Die Listerienanzahl in Gruppe 2 war ebenfalls sehr hoch. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die durch die SB824(pHR281)-Immunisierung induzierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen Mäuse zwar vor einer *Listeria*-(Wildtyp) Infektion schützen, aber keinen Schutz bei der *List* 217Ser-Infektion vermitteln.

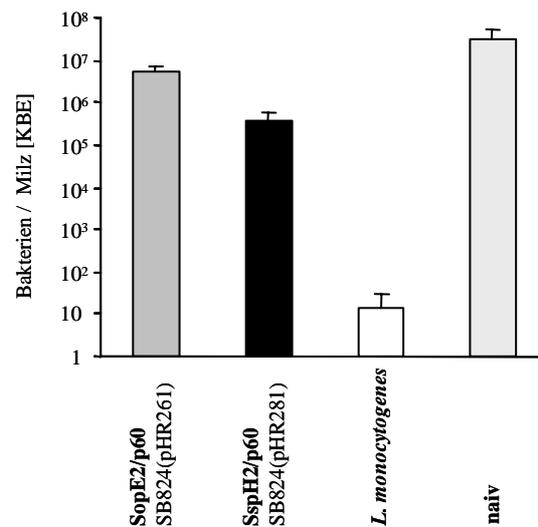


Abbildung 11: Schutzversuch nach einer Infektion mit einer letalen *Listeria* 217Ser-Dosis. BALB/c Mäuse wurden oral mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) immunisiert. Die Kontrollgruppe wurde primär mit einer subletalen *Listeria*-Dosis infiziert (0,1 x LD₅₀). Sechs Wochen nach der Immunisierung wurden alle Gruppen einer letalen Dosis an *List* 217Ser ausgesetzt (10 x LD₅₀). Naive Mäuse dienten als Kontrolle für die Infektion. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Milzen isoliert und die KBE der überlebenden Listerien bestimmt (\pm SD, n = 4 Mäuse / Gruppe). Das Experiment ist repräsentativ für zwei ähnliche Versuche.

Aufgrund dieses Ergebnisses stellte sich die Frage, ob die durch die Immunisierung induzierten CD8⁺ T-Zellen bei den beiden Gruppen SB824(pHR261) und SB824(pHR281) quantitative oder qualitative Unterschiede aufweisen. Hierfür wurden die generierten CD8⁺ T-Zellen näher charakterisiert.

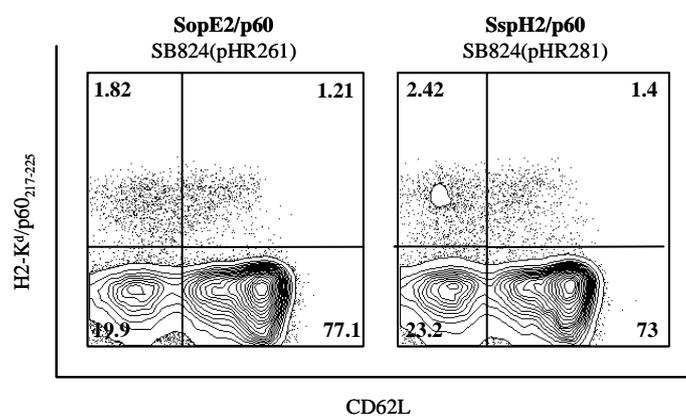
3.7 Nachweis antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels Tetramer-Technologie

Die Analyse der CD8⁺ T-Zellen mittels ELISPOT-Assay unterliegt gewissen Einschränkungen. Bei dieser Methode wird die CD8⁺ T-Zellzahl ausschließlich über die IFN- γ -Sekretion bestimmt, so dass die Sensitivität stark von der Affinität und Menge des IFN- γ zu dem Antikörper abhängt (Paul 1998). Des Weiteren kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass zusätzlich andere Zellen (CD4⁺ T-Zellen) stimuliert werden und mit in die Messung einbezogen werden. Der größte Nachteil ist der Einsatz unseparierter Milzzellen, so dass keine definierte Zellzahlaussage pro Milz möglich ist. Eine weitaus sensitivere Methode zur CD8⁺ T-Zelluntersuchung, bezüglich Zellzahl und Antigenpezifität, stellt die Tetramer-Technologie dar. Hierbei handelt es sich um eine Methode, mit der antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen direkt *ex vivo* analysiert werden können, ohne jede weitere Manipulation der Zellen. Es werden lösliche, tetramere Peptid-MHC-Klasse I-Komplexe verwendet, um antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen per FACS analysieren zu können. Zu diesem Zweck wird

die schwere MHC-Klasse I-Kette in Gegenwart von β 2-Mikroglobulin und dem gewünschten Peptid *in vitro* gefaltet und anschließend biotinyliert. Durch die Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin, welches vier Biotin-Bindungsstellen aufweist, bilden sich tetramere Komplexe, die gleichzeitig mehrere T-Zellrezeptoren (TCR) auf einer spezifischen $CD8^+$ T-Zelle binden können. Peptid-MHC-Klasse I-Tetramere binden zytotoxische T-Zellen (CTLs) mit einer Sensitivität von bis zu 1 in 5000 $CD8^+$ T-Zellen (Constantin *et al.*, 2002). Dies erlaubt die Analyse von CTLs, die nur in geringen Frequenzen (Prozentzahl, die mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt wird) vorkommen. Für die Detektion p60-spezifischer CTLs in BALB/c-Mäusen wurden H2-K^d/ β 2M/p60₂₁₇₋₂₂₅PE-Tetramere (im Folgenden Tetramer genannt) verwendet.

Mit Hilfe einer antigenspezifischen Tetramerfärbung und weiteren Oberflächenmarkern ist somit eine sehr spezifische Analyse von $CD8^+$ T-Zellen möglich. Der Aktivierungsstatus der $CD8^+$ Tetramer⁺ T-Zellen wurde mit dem Oberflächenmarker CD62L (L-Selektin) überprüft, dessen Expression bei aktivierten $CD8^+$ T-Zellen gegenüber naiven T-Zellen herunterreguliert wird. Sechs Wochen nach der Immunisierung in Mäusen mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) wurden die Milzzellen mit p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischem Tetramer gefärbt. In den Milzzellen beider Immunisierungsgruppen konnten aktivierte p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden, wie in Abbildung 12A exemplarisch dargestellt. Die beiden mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) immunisierten Gruppen zeigen vergleichbare Frequenzen an antigenspezifischen CTLs (Gruppe 1 mit 1,82% und Gruppe 2 mit 2,42%). Die Berechnung der absoluten $CD8^+$ T-Zellfrequenzen (Abbildung 12B) ergibt zwischen den beiden Immunisierungsgruppen keinen signifikanten Unterschied ($P \geq 0,05$).

A)



B)

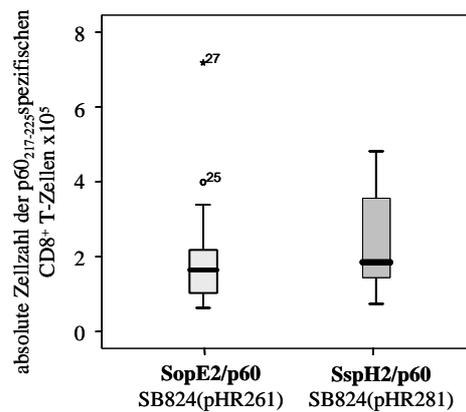
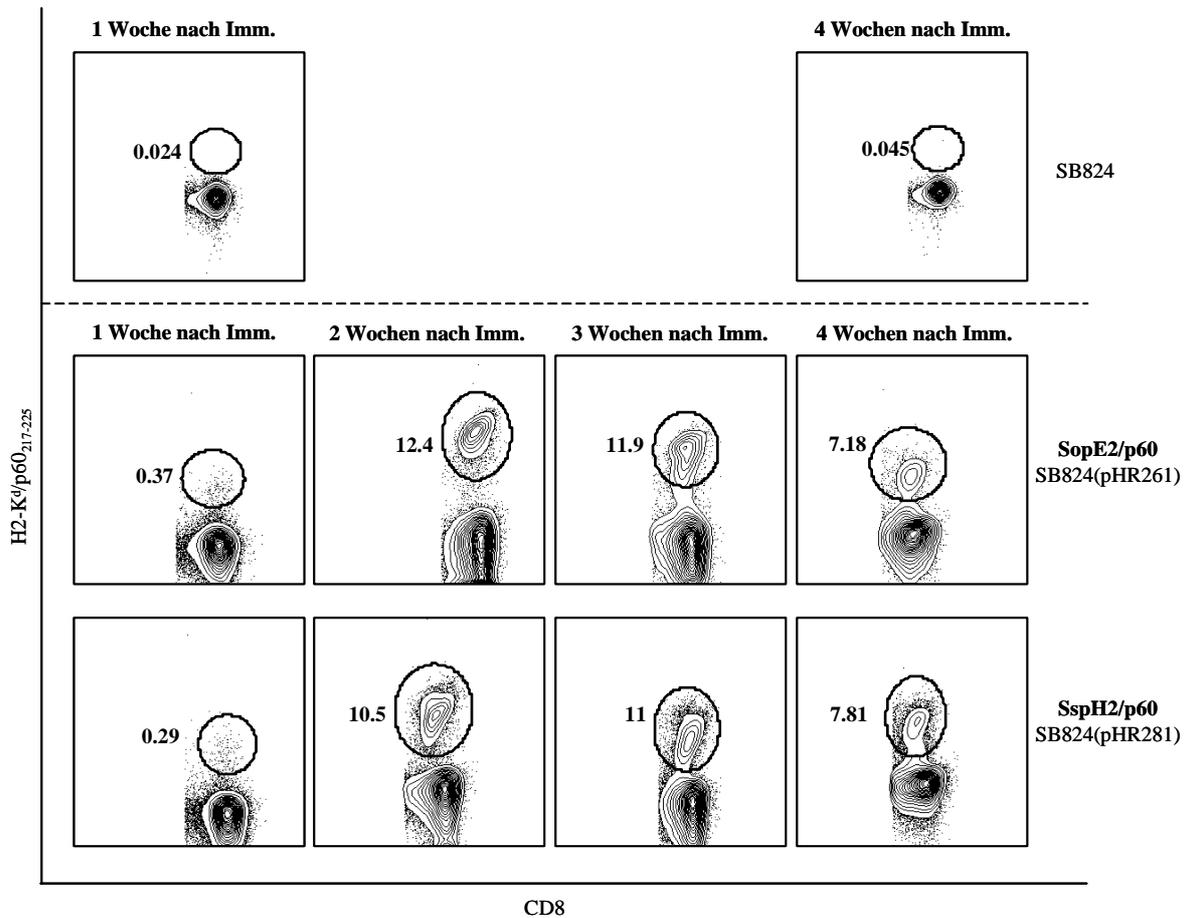


Abbildung 12: Frequenzen p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach einer oralen Immunisierung. BALB/c Mäuse wurden mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) immunisiert. Sechs Wochen nach der Immunisierung wurde den Mäusen die Milz entfernt. Die erhaltenen Zellen wurden je weils mit anti-CD8 α , anti-CD62L und p60₂₁₇₋₂₂₅ Tetramer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) In dem gezeigten *contour plot* wurden die CD8⁺ T-Zellen markiert. Jeder *contour plot* ist repräsentativ für 5- 15 Mäuse pro Gruppe. (B) Darstellung der jeweiligen p60₂₁₇₋₂₂₅-Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen als Absolutzahlen im Balkendiagramm (n = 12- 18 Mäuse/ Gruppe).

Um die Expansion der spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort nach der Immunisierung mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) zu untersuchen, wurden zusätzlich Tetramer-Färbungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Die Kinetik der CD8⁺ Tetramer⁺ T-Zellexpansion ist als Prozentzahl von allen CD8⁺ T-Zellen in Abbildung 13A dargestellt. Als Negativkontrolle diente eine immunisierte Gruppe mit dem Stamm SB824. Eine Woche nach Immunisierung konnte nur eine sehr diskrete Frequenz an p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. An Tag 14 nach Immunisierung zeigte sich dagegen eine starke Expansion bei beiden Immunisierungsgruppen. Die immunisierten Mäuse mit SB824(pHR261) hatten 12,4% p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen, bei der Gruppe, die mit SB824(pHR281) immunisiert worden war, waren es 10,5%. Drei Wochen nach Immunisierung konnte keine nennenswerte Erhöhung der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden. Es folgte die Kontraktionsphase der CD8⁺ T-Zellen, die in der vierten Woche nach Immunisierung einsetzte.

Die Kinetik der Expansion p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen, die SopE2/p60 bzw. SspH2/p60 exprimieren, zeigt somit keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 13B).

A)



B)

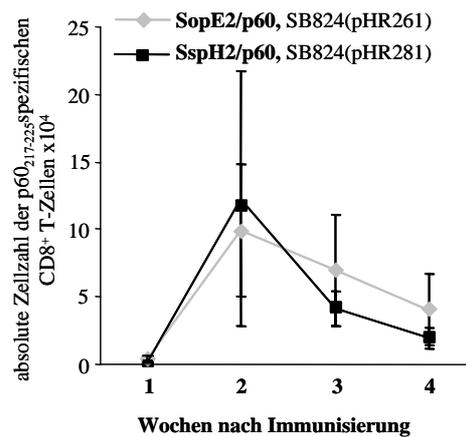


Abbildung 13: Analyse der CD8⁺ T-Zellexpansion nach oraler Immunisierung. BALB/c Mäuse wurden mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) immunisiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung wurde den Mäusen die Milz entfernt. Die erhaltenen Zellen wurden jeweils mit anti-CD8 α und p60₂₁₇₋₂₂₅ Tetramer gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) In den gezeigten *contour plots* ist die Frequenz der CD8⁺Tetramer⁺ T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Jeder *contour plot* ist repräsentativ für 4- 10 Mäuse. (B) Darstellung der jeweiligen p60₂₁₇₋₂₂₅-Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen als gemittelte Absolutzahlen (\pm SD).

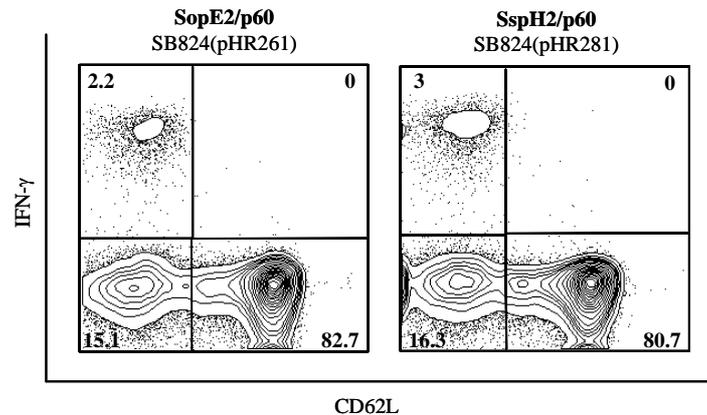
3.8 Funktionalität der p60-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

3.8.1 Antigen-spezifische Zytokinproduktion

Um eine Korrelation zwischen Tetramer- Frequenz und IFN- γ -Frequenz herzustellen, wurden die Milzzellen von immunisierten Mäusen mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) sowohl für eine intrazelluläre Zytokinfärbung, als auch für eine p60₂₁₇₋₂₂₅-Tetramer-Färbung verwendet. Mit Hilfe der funktionellen Zytokinexpressions-Analyse sollte gezeigt werden, dass es sich bei den aktivierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Tetramer-Färbung) tatsächlich um CTLs mit Effektorfunktion handelt. Hiefür wurde die IFN- γ -Sekretion ebenfalls mit FACS-Analyse bestimmt (intrazelluläre Zytokinfärbung), anstatt mit der ELISPOT-Methode. Der Vorteil der Tetramer-Methode ist, dass die Zellen *ex vivo* weniger stark manipuliert werden als beim ELISPOT, dass Oberflächenmarker zur genaueren Charakterisierung der CD8⁺ T-Zellen verwendet werden können, und dass eine bessere Quantifizierung der Zellzahlen möglich ist. Die Mäuse wurden oral mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) immunisiert. Sechs Wochen nach der Immunisierung wurde die IFN- γ -Produktion der Milzzellen analysiert. Zur Stimulierung der IFN- γ -Produktion wurden die Milzzellen aus den immunisierten Mäusen der beiden Gruppen vor der intrazellulären Färbung mit dem MHC-Klasse I-Epitop p60₂₁₇₋₂₂₅ inkubiert. Als Negativkontrollen wurden die Milzzellen zum einen mit p60₂₁₇₋₂₂₅-Peptid stimuliert und mit einem Isotyp-Antikörper gefärbt und zum anderen mit Acetonitril stimuliert und wie die p60₂₁₇₋₂₂₅-stimulierten Proben behandelt (Daten nicht gezeigt, da der Hintergrund der IFN- γ ⁺CD8⁺ T-Zellen < 0,05% war).

In Abbildung 14A ist zu sehen, dass die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen beider Immunisierungsgruppen IFN- γ sekretieren. Auch hier ist eine höhere Frequenz bei der Immunisierung mit SB824(pHR281) im Vergleich mit SB824(pHR261) zu erkennen, wie dies bei der Tetramer-Frequenz der Fall war. Dennoch ist ein Unterschied von 0,8% nicht als signifikant anzusehen. In Abbildung 14B sind die absoluten Zellzahlen an antigenspezifischen IFN- γ -sekretierenden CD8⁺ T-Zellen der beiden Immunisierungsgruppen zu sehen, auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied (nach dem Mann-Whitney U Test $P \geq 0,05$). Der direkte Vergleich der absoluten Zellzahlen beider Immunisierungsgruppen demonstriert, dass die Anzahl der IFN- γ -sekretierenden CD8⁺ T-Zellen leicht erhöht im Vergleich zu der Anzahl der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ist. Eine Erklärung hierfür ist, dass einige p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu niedrig affin für das 4fach-Multimer sind. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass durch die orale Immunisierung p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen mit Effektorfunktion induziert werden.

A)



B)

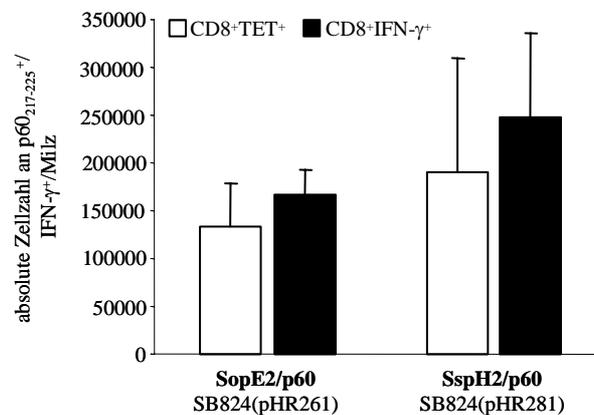


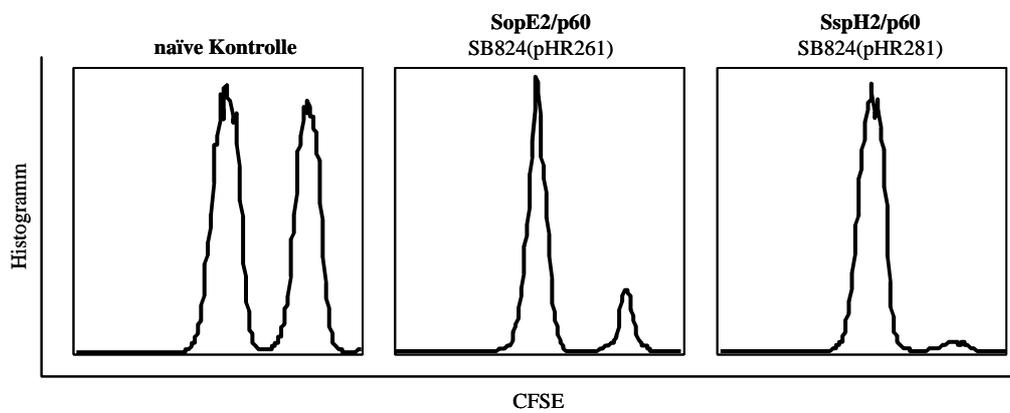
Abbildung 14: Frequenzen der IFN- γ -produzierenden und p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach oraler Immunisierung. Milzzellen aus Mäusen mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) oral immunisiert wurden in Gegenwart von p60₂₁₇₋₂₂₅ Peptid für 5h inkubiert, anschließend mit anti-CD8 α und anti-CD62L auf der Zelloberfläche, und für die intrazelluläre Färbung mit anti-IFN- γ gefärbt. Für die Tetramerfärbung wurden die Milzzellen mit anti-CD8 α , mit anti-CD62L und mit p60₂₁₇₋₂₂₅ Tetramer gefärbt. (A) In dem *contour plot* wurden die CD8⁺ T-Zellen markiert. (B) Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl (\pm SD) an p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (offene Balken) und p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen (schwarz ausgefüllte Balken) (n = 3 Mäuse/ Gruppe). Das Experiment ist repräsentativ für mindestens fünf ähnliche Versuche.

3.8.2 Effektorfunktion der CTLs

Um die Effektorfunktion der *in vivo* generierten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen näher zu analysieren, wurde sechs Wochen nach der oralen Immunisierung ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt. Bei diesem Test wird die antigenspezifische zytotoxische Aktivität in immunisierten Mäusen mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) bestimmt. Naive Mäuse dienten als Negativkontrolle. Diese Kontrollmäuse sind nicht in der Lage, p60-peptidbeladene Zellen (CFSE^{hoch}) oder unbeladene Kontrollzellen (CFSE^{niedrig}) zu lysieren, da

sie keine p60-spezifischen CTLs haben (Abbildung 15A). Die Lysefähigkeit wurde zu einem frühen (5 h) und zu einem späten Zeitpunkt (20 h) untersucht (Abbildung 15B). Mäuse, die mit rekombinanten Salmonellen immunisiert wurden, die SopE2/p60 oder SspH2/p60 exprimieren, zeigten schon nach 5 h eine lytische Aktivität von etwa 33% ($\pm 3\%$) (erstere Immunisierungsgruppe) bzw. 45% ($\pm 5\%$) bei der zweiten Gruppe (Abnahme des CFSE^{hoch} Peaks). Nach 20 h erreichte die spezifische Lyse der CTLs in den beiden immunisierten Gruppen 66% ($\pm 19\%$) bzw. 93% ($\pm 4\%$).

A)



B)

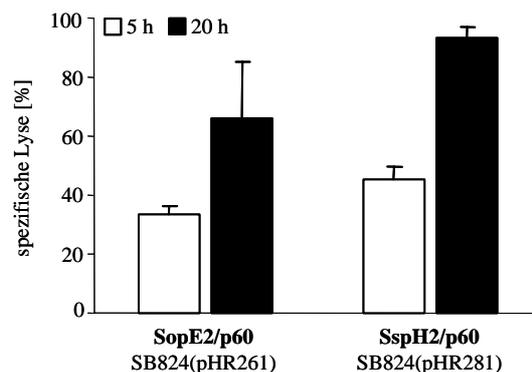


Abbildung 15: Messung der zytotoxischen Effektorfunktion *in vivo* nach einer oralen Immunisierung. Milzzellen aus naiven Mäusen wurden mit p60₂₁₇₋₂₂₅-Peptid beladen und mit einer hohen Konzentration an CFSE markiert (CFSE^{hoch}). Zur Kontrolle der Antigen-spezifität wurden nichtbeladene Milzzellen mit einer niedrigen Konzentration markiert (CFSE^{niedrig}). Eine 1:1- Mischung dieser Zellen wurde i.v. in naive Kontrollmäuse und in die immunisierten Mäuse injiziert. (A) Nach 20 h wurden die Milzen der Tiere entnommen und die Prozentzahl der CFSE-markierten Zellen per FACS analysiert. (B) Die Balkendiagramme geben den durchschnittlichen Prozentsatz (\pm SD) der spezifischen Lyse in den beiden Gruppen nach 5 h (offene Balken) und 20 h (schwarz ausgefüllte Balken) wieder. Das Verhältnis von CFSE^{hoch} zu CFSE^{niedrig} wurde bestimmt und der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde berechnet (wie in Material und Methoden angegeben) (n= 3 Mäuse/Gruppe).

Übereinstimmend mit den detektierten CD8⁺Tetramer⁺ T-Zellpopulationen konnte in beiden Immunisierungsgruppen SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) eine zytotoxische Effektorfunktion der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Der Unterschied der lytischen Aktivität zwischen den beiden Gruppen zum späteren Zeitpunkt ist aufgrund der Schwankungen innerhalb der ersten Gruppe nicht signifikant ($P \geq 0,05$). Zusammenfassen zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass in beiden Immunisierungsgruppen funktionelle p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen generiert wurden.

3.9 Generierung von antigenspezifischen CD8⁺-Gedächtniszellen nach einer oralen Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen

Die Induktion einer langfristigen Gedächtnisantwort ist eine Grundvoraussetzung für die optimale Effizienz einer Vakzine. In Menschen und Mäusen konnten bis jetzt zwei verschiedene Gedächtnis T-Zellpopulationen, T_{ZM} (zentrale *memory*/ Gedächtniszellen) und T_{EM} (Effektor-*memory*/ Gedächtniszellen) identifiziert werden. Das Ergebnis der Belastungsinfektion (siehe 3.5 und 3.6) könnte aufgrund einer quantitativ und qualitativ unterschiedlichen Entwicklung der Gedächtniszellen bei den beiden Immunisierungsgruppen bedingt sein. Eine Diskriminierung der beiden Gedächtniszell-Subpopulationen ist mit Hilfe der unterschiedlichen Expression des Oberflächenmarkers IL-R α (CD127) in Kombination mit CD62L möglich. Dies ist in Abbildung 16 schematisch dargestellt. T_{ZM} weisen einen CD127^{high}/CD62L^{high}- und T_{EM} den CD127^{high}/CD62L^{low}-Phänotyp auf. Die Effektorzell-Population T_E kann aufgrund dieser Oberflächenmarker von den beiden Gedächtniszell-Populationen abgegrenzt werden.

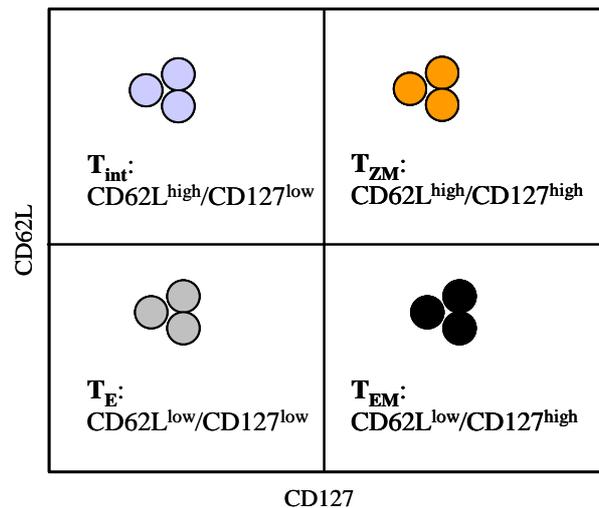


Abbildung 16: Schematische Darstellung der CD8⁺ T-Zellsubpopulationen. Charakterisierung der CD8⁺ T-Zellsubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker.

Um zu untersuchen, ob die orale Immunisierung mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) diese beiden Gedächtniszell-Populationen induziert, wurden Milzen beider Gruppen sechs Wochen nach der Immunisierung mit dem Oberflächenmarker anti-CD127 und anti-CD62L gefärbt. Es konnte in beiden Immunisierungsgruppen jeweils die T_{ZM}- als auch die T_{EM}-Population nachgewiesen werden. Bei der Verteilung der T_{ZM}- und T_{EM}-Population ist zwischen den Gruppen, die mit rekombinanten Salmonellen immunisiert worden waren, die SopE2/p60 bzw. SspH2/p60 exprimieren, nur ein geringfügiger Unterschied zu erkennen (Abbildung 17).

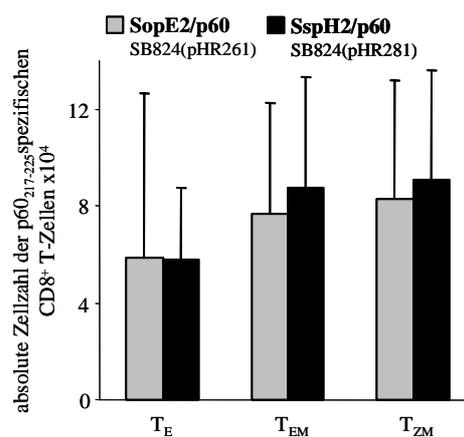


Abbildung 17: Verteilung der Gedächtniszell-Subpopulationen nach oraler Immunisierung. BALB/c Mäuse wurden mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) oral immunisiert. Die isolierten Milzzellen wurden sechs Wochen nach Immunisierung mit anti-CD62L, anti-CD8 α , anti-CD127 und p60₂₁₇₋₂₂₅-Tetramer gefärbt und am Cyan analysiert. Absolute Anzahl der CD8⁺ p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen T-Zellsubpopulationen (\pm SD), (n= 3-7 Mäuse/ Gruppe).

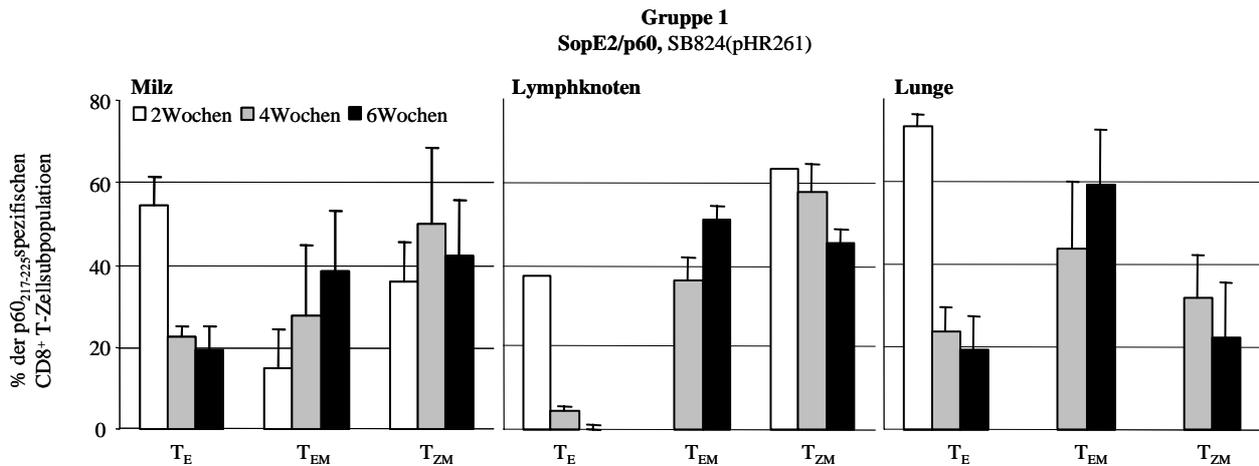
Beide Gruppen haben etwa gleich hohe Anteile an T_{EM} und T_{ZM} . Aufgrund der großen Schwankungen innerhalb der Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (T_E , T_{EM} und T_{ZM} - Population jeweils $P \geq 0,05$).

3.10 Lokalisation der $CD8^+$ T-Zellsubpopulationen

Die T_{ZM} - und T_{EM} -Populationen unterscheiden sich zusätzlich funktionell aufgrund ihrer Proliferationsfähigkeit und Effektorfunktion. T_{ZM} können sehr schnell nach Antigenkontakt proliferieren, zeigen jedoch keine sofortige Effektorfunktion. T_{EM} hingegen weisen ein schwaches Proliferationsvermögen auf, sind jedoch zu einer sehr starken und schnellen Effektorfunktion befähigt, vergleichbar mit der T_E -Population. Die T_{ZM} sind in lymphatischen Organen lokalisiert, wie z.B. in den Lymphknoten und der Milz. Die T_{EM} -Population wird dagegen hauptsächlich in nicht-lymphatischen Organen aufgefunden, wie z.B. in der Lunge, in der häufig der erste Antigenkontakt stattfindet (Busch *et al.*, 1998; Huster *et al.*, 2004). Die Verteilung von p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen $CD8^+$ T-Zellpopulationen wurde folglich in lymphatischen Organen (Milz und Lymphknoten) und in einem nicht-lymphatischen Organ (Lunge) untersucht. Zusätzlich wurde eine Zeitkinetik durchgeführt, um die Entwicklung der Subpopulationen in den verschiedenen Organen zu verfolgen.

Die drei untersuchten Organe (Milz, Lymphknoten und Lunge) wiesen ein vergleichbares Verteilungsmuster bezüglich T_E , T_{EM} und T_{ZM} auf (Abbildung 18A und B).

A)



B)

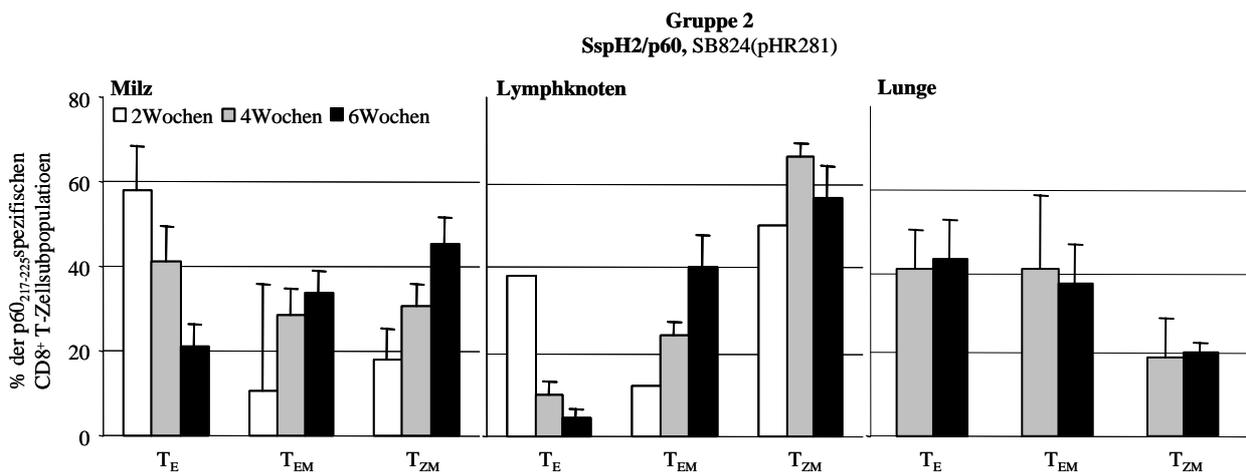


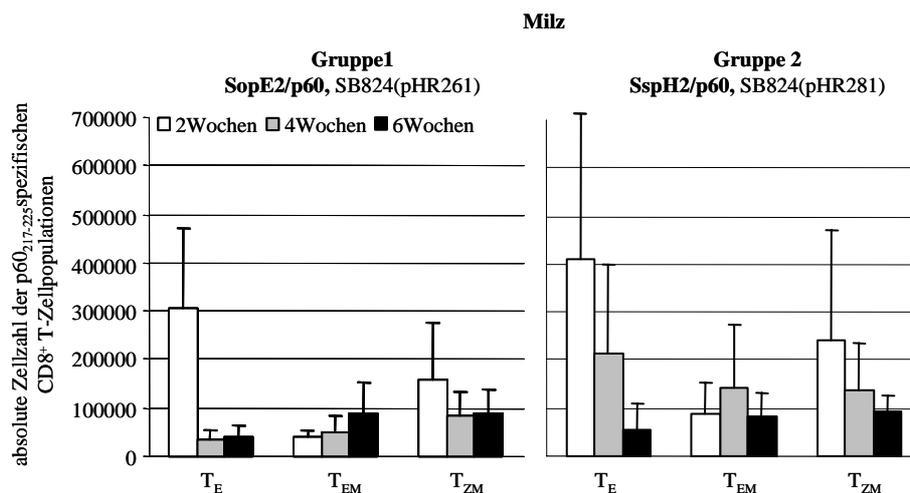
Abbildung 18: Relative Verteilung der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen nach der oralen Immunisierung. BALB/c Mäuse wurden oral mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) immunisiert. Zwei, vier und sechs Wochen nach der Immunisierung wurden Milz, Lunge, Lk präpariert, die Zellen isoliert und mit anti-CD8 α , anti-CD127/ anti-CD62L und p60₂₁₇₋₂₂₅-Tetramer gefärbt. Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittliche prozentuale Verteilung (\pm SD) an p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zwei Wochen (offene Balken), vier Wochen (grau ausgefüllte Balken) und sechs Wochen (schwarz ausgefüllte Balken) nach der Immunisierung. (A) Immunisierung mit SB824(pHR261), (B) Immunisierung mit SB824(pHR281) (n= 2-7 Mäuse/ Gruppe).

In der Milz sind alle drei CD8⁺ T-Zellpopulationen in beiden Immunisierungsgruppen in ähnlicher Höhe vorhanden. Die relative Verteilung der T_{ZM} bei der mit SB824(pHR261) immunisierten Gruppe, nachfolgend als Gruppe 1 bezeichnet (Abbildung 18A), sowohl zwei als auch vier Wochen nach Immunisierung ist höher als bei der mit SB824(pHR281) immunisierten Gruppe (Gruppe 2, Abbildung 18B). Nach sechs Wochen ist der Anteil an T_{ZM} in der Milz bei Gruppe 1 und 2 jedoch gleich und stellt die dominierende Subpopulation dar.

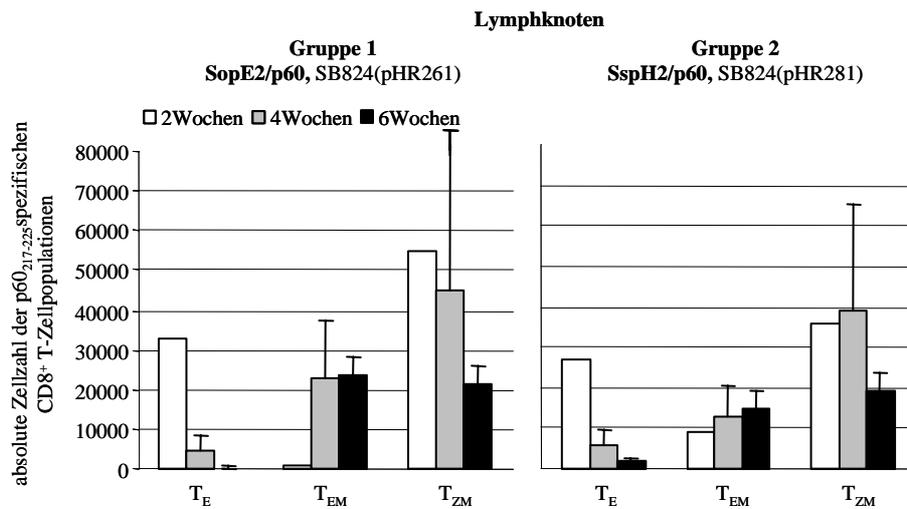
Bei der Gruppe 2 herrscht im Lymphknoten ebenfalls zu jedem Zeitpunkt der T_{ZM} -Anteil vor. Betrachtet man die relative Verteilung im Lymphknoten der Gruppe 1, ist der Anteil der T_{EM} nach sechs Wochen geringfügig höher als der T_{ZM} -Anteil. Zu den Zeitpunkten 2 und 4 Wochen nach Immunisierung hingegen dominiert der T_{ZM} -Anteil, vergleichbar mit der Gruppe der SB824(pHR281)-immunisierten Mäuse. In der Lunge befinden sich sowohl bei Gruppe 1 als auch bei Gruppe 2 vornehmlich die beiden $CD8^+$ T-Zellpopulationen, die kaum $IL-7R\alpha$ exprimieren ($CD127^{low}$). Der T_E -Anteil nach sechs Wochen in der Lunge ist bei Gruppe 1 geringer ($19\% \pm 8\%$) als bei der Gruppe 2 ($43\% \pm 10\%$), der T_{EM} -Anteil ist umgekehrt verteilt, Gruppe 1 hat einen höheren Anteil ($60\% \pm 14\%$) als Gruppe 2 ($T_{EM} 37\% \pm 10\%$).

Um eine Prognose für die Schutzwirkung zu erstellen, spielen die absoluten Zahlen an induzierten Gedächtniszellen eine größere Rolle (Abbildung 19A und B). Des Weiteren macht der zeitliche Verlauf der T-Zellanalyse die unterschiedlich lange Lebensdauer der einzelnen Subpopulationen deutlich, unabhängig von der Lokalisation. Die Anzahl der T_E nimmt im Verlauf von vier Wochen in allen untersuchten Organen in beiden Immunisierungsgruppen deutlich ab, es kommt zu einer Reduktion von über 90%. Bei der mit SB824(pHR261) immunisierten Gruppe ist die Kontraktion der T_E -Population in Milz und Lunge besonders stark.

A)



B)



C)

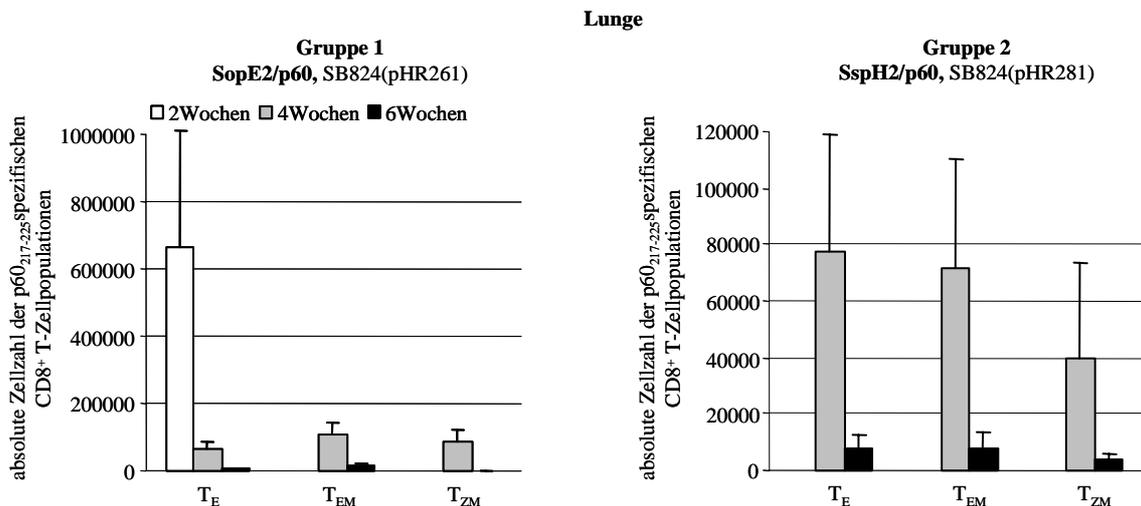


Abbildung 19: Absolute Verteilung der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen nach oraler Immunisierung. BALB/c Mäuse wurden oral mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) immunisiert. Zwei, vier und sechs Wochen nach der Immunisierung wurden Milz, Lunge, mLN und axilläre LN präpariert, die Zellen isoliert und mit anti-CD8 α , anti-CD127/ anti-CD62L und p60₂₁₇₋₂₂₅-Tetramer gefärbt. Das Balkendiagramm zeigt die absoluten Zellzahlen an p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zwei Wochen (offene Balken), vier Wochen (grau ausgefüllte Balken) und sechs Wochen (schwarz ausgefüllte Balken) nach der Immunisierung. (A) Absolute Zellzahl-Auswertung der Milz, (B) absolute Zellzahl-Auswertung der Lymphknoten und (C) absolute Zellzahl-Auswertung der Lunge (n= 2-7 Mäuse/ Gruppe).

In der Milz und im Lymphknoten bleibt die Zahl an vorhandenen Gedächtniszellen konstant. In der Lunge hingegen hat die absolute Zahl an T_{EM} und T_{ZM} nach sechs Wochen bei beiden Immunisierungsgruppen deutlich abgenommen. Das Überleben der T_{EM} und T_{ZM} vornehmlich in den lymphatischen Organen ist charakteristisch für Gedächtniszellen und bei beiden Immunisierungsgruppen gleich.

Der Vergleich der durch die beiden *Salmonella*-Impfstämme induzierten CD8⁺ T-Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede. In der Milz von Mäusen, die mit SB824(pHR261) immunisiert worden waren, befinden sich nach sechs Wochen im Mittelwert $\cong 175.00 (\pm 117.634)$ Gedächtniszellen (T_{ZM} und T_{EM}). Nach Immunisierung mit SB824(pHR281) sind im Mittel $\cong 175.000 (\pm 84.016)$ Gedächtniszellen vorhanden. In den analysierten Lymphknoten sind nach sechs Wochen zwar unterschiedliche Anteile an T_{EM} (Gruppe 1 $\cong 24.000$, Gruppe 2 $\cong 14.500$) detektierbar, die jedoch nicht als signifikant anzusehen sind ($P \geq 0,05$). Der T_{ZM} -Anteil in beiden Gruppen ist etwa gleich hoch, auch hier ist kein signifikanter Unterschied feststellbar.

In der Lunge ergeben die analysierten Gedächtniszellen (T_{EM} und T_{ZM}) zwischen den beiden Immunisierungsgruppen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

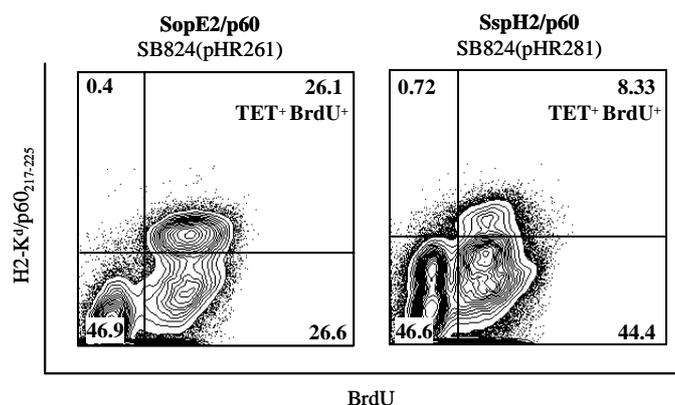
Diese Ergebnisse zeigen eine erfolgreiche Induktion p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach der oralen Immunisierung mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) in lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen. Es wird außerdem deutlich, dass die Gedächtnis T-Zellpopulationen T_{EM} und T_{ZM} in beiden Immunisierungsgruppen existieren und deren Verteilungsmuster in beiden Immunisierungen sehr ähnlich sind, d.h. zwischen der mit SB824(pHR261) oder SB824(pHR281) immunisierten Gruppe waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

3.11 Proliferation der T_{ZM} -Population

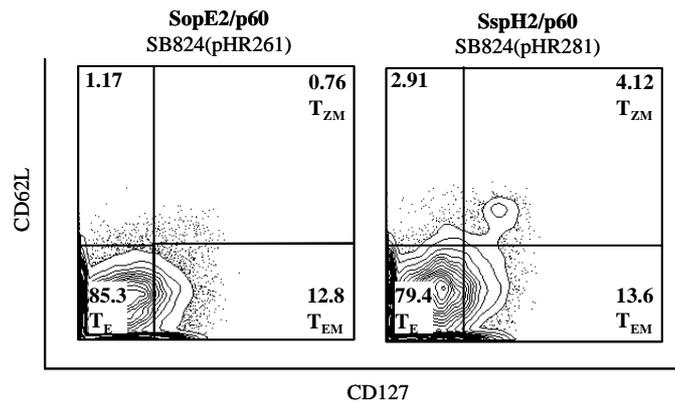
In den bisher beschriebenen Versuchen wurde eingehend die Immunantwort nach der oralen Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen, die SopE2/p60 bzw. SspH2/p60 exprimieren, untersucht, und es zeigte sich, dass zytotoxische Effektorzellen wie auch zentrale Gedächtniszellen gebildet werden konnten. Trotz dieser wichtigen Voraussetzung für einen effektiven Impfstoff, konnte nur in einer der beiden Immunisierungsgruppen Schutz vermittelt werden. Um diese interessante Beobachtung näher zu analysieren, wurde ein *in vivo* Proliferationstest durchgeführt, mit dem die Proliferationsfähigkeit der T_{ZM} nach Antigenkontakt untersucht werden sollte. Hierfür wurden Mäuse sechs Wochen nach der Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen, die SopE2/p60 oder SspH2/p60 exprimieren, mit einer letalen Dosis von *L. monocytogenes* (5 x LD₅₀) infiziert und den Tieren intraperitoneal BrdU (1 mg/100 μ l) injiziert. In den nachfolgenden vier Tagen wurde das Trinkwasser der Mäuse ebenfalls mit BrdU versetzt. Nach fünf Tagen wurden die Milzzellen isoliert und mit Oberflächenmarkern und anti-BrdU gefärbt. Mäuse, die mit SB824(pHR261)

immunisiert worden waren, hatten etwa 26,1% BrdU in die antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen inkorporiert, wie in Abbildung 20A repräsentativ dargestellt ist. Bei der Immunisierung mit SB824(pHR281) waren es 8,33%. Die Verteilung der T-Zellsubpopulationen nach BrdU-Inkorporation war in beiden Immunisierungsgruppen wie erwartet, dies ist in Abbildung 20B exemplarisch demonstriert. Nach der letalen Belastung mit *L. monocytogenes* waren in beiden Gruppen kaum noch T_{ZM}-Frequenzen zu messen. Als Positivkontrolle wurde eine Listerien-infizierte Gruppe mitgeführt. Die berechneten Prozentanteile der einzelnen Subpopulationen nach zweitem Antigenkontakt sind in Abbildung 20C graphisch dargestellt. Die Mäuse, die mit rekombinanten Salmonellen immunisiert worden waren, die SopE2/p60 exprimieren, hatten nur noch einen Anteil von 1% T_{ZM}. Die Mäuse, die mit rekombinanten Salmonellen immunisiert worden waren, die SspH2/p60 exprimieren, zeigten noch 3% T_{ZM}, die Listerien-infizierte Gruppe 11% T_{ZM}. Der erneute Antigenkontakt nach der Immunisierung durch das p60-Protein von *L. monocytogenes* hat zu einer fast vollständigen Proliferation der T_{ZM} zu p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen Effektorzellen geführt, um diese zur Eliminierung der Listerien zur Verfügung zu stellen. Bei der Immunisierungsgruppe 1 ist ein T_E-Anteil von 71% berechnet, bei der Immunisierungsgruppe 2 und der Listerien-infizierten Gruppe sind es 75%. Der Anteil der T_{EM} hat sich in allen Gruppen ebenfalls stark verringert, d.h. auch diese Zellpopulation wurde zur Eliminierung der Infektion herangezogen.

A)



B)



C)

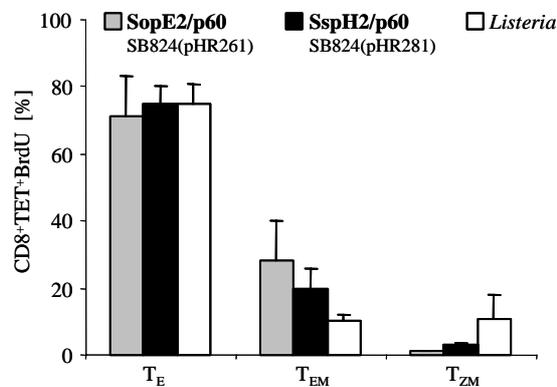


Abbildung 20: In vivo Proliferation antigenspezifischer T-Zellen während einer *L. monocytogenes*-Infektion. BALB/c Mäuse wurden oral mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) immunisiert, die Kontrollgruppe wurde primär mit *L. monocytogenes* infiziert (0,1 x LD₅₀). Sechs Wochen nach der Immunisierung wurden alle Gruppen einer hohen Dosis an *L. monocytogenes* ausgesetzt (5 x LD₅₀), sowie mit BrdU (10mg/ml) injiziert. Fünf Tage nach Infektion wurden die Milzzellen mit anti-CD62L, anti-CD8α, anti-CD127, anti-BrdU und p60₂₁₇₋₂₂₅-Tetramer gefärbt und am Cyan analysiert. (A) In den contour plots ist die prozentuale Verteilung der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach BrdU-Aufnahme dargestellt, (B) sowie die prozentuale Verteilung der T-Zellsubpopulationen nach Proliferation. (C) Darstellung der berechneten prozentualen Verteilung der T-Zellsubpopulationen nach BrdU-Aufnahme im Balkendiagramm (n= 3 Mäuse/Gruppe). Das Experiment ist repräsentativ für mindestens drei ähnliche Versuche.

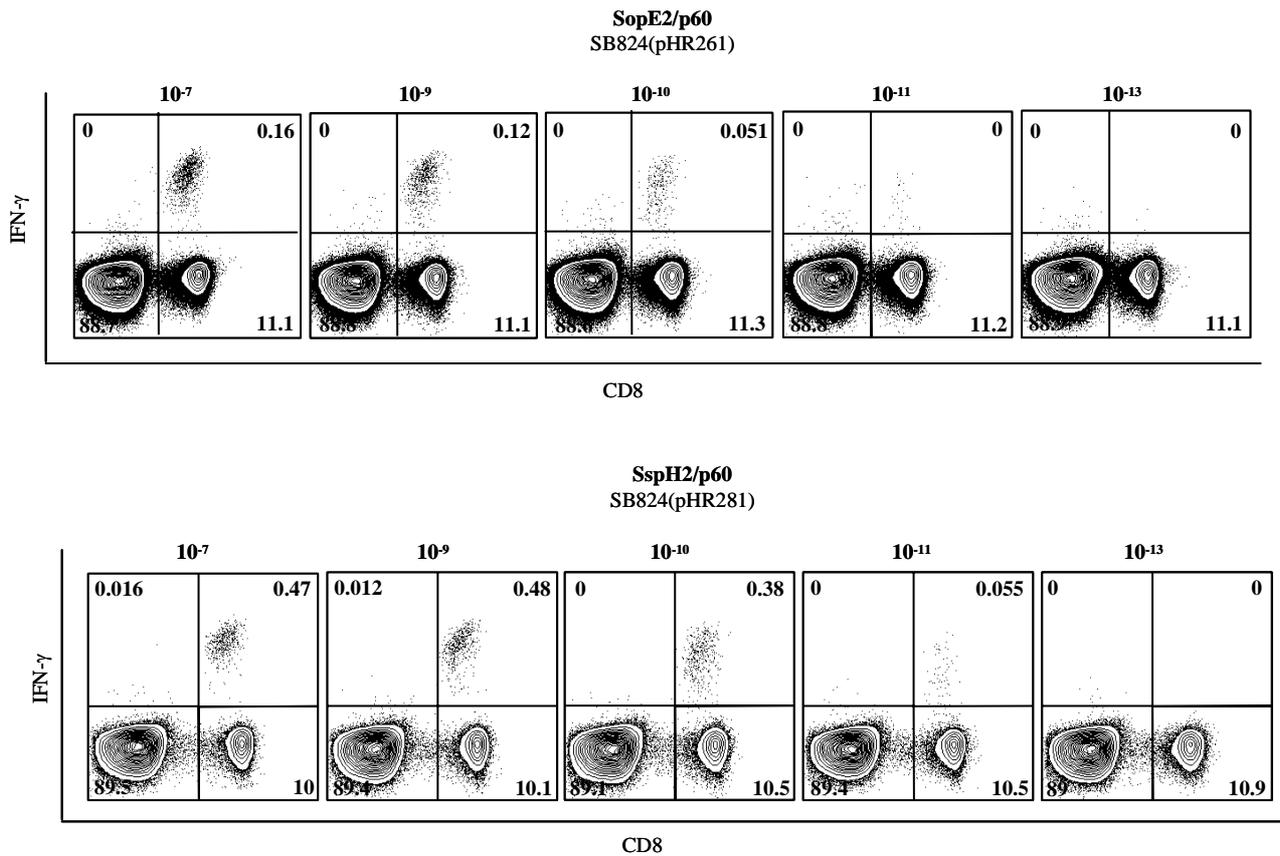
Die Daten der Proliferationskapazität zeigen, ähnlich zu den vorherigen Ergebnissen, keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Immunisierungsgruppen SB824(pHR261) und SB824(pHR281). Ein geringer Unterschied konnte in der verbleibenden T_{EM}-Anzahl registriert werden. Bei der mit SB824(pHR261) immunisierten Gruppe waren 28% (± 12%) an T_{EM} vorhanden, bei der mit SB824(pHR281) immunisierten Gruppe waren es 20% (± 6%). Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass der fehlende Schutz bei der Immunisierung mit SB824(pHR261) aufgrund eines Proliferationsdefektes der induzierten CD8⁺ T-Zellen hervorgeht, da bei beiden Immunisierungsgruppen die generierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen

CD8⁺ T_{ZM}-Zellen in der Lage sind, nach zweitem Antigenkontakt in Form einer Listerien-Infektion, zu proliferieren.

3.12 Bestimmung der funktionellen Avidität

Während der Antigen-Erkennung zeigen T-Zellen eine hohe Sensitivität und Spezifität, jedoch nur eine niedrige Affinität zu dem Peptid/MHC-Klasse I-Komplex. Die Affinität spiegelt die Stärke der nicht-kovalenten Interaktion zwischen der einzelnen Antigen-Bindungsstelle auf der T-Zelle und dem einzelnen Epitop wider. Die Stärke der multiplen Interaktionen zwischen dem T-Zellrezeptor und dem Peptid/MHC-Klasse I-Komplex wird als funktionelle Avidität bezeichnet. Eine hohe Avidität kompensiert eine niedrige Affinität. Zur Überprüfung der Avidität des p60₂₁₇₋₂₂₅-Peptids (Peptid/MHC-Klasse I-Komplex) zu den generierten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden Milzzellen von Mäusen isoliert, die mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) immunisiert worden waren. Danach wurden die CD8⁺ T-Zellen *in vitro* mit abnehmender Molarität des p60₂₁₇₋₂₂₅-Peptids stimuliert und die IFN- γ -Produktion gemessen. Die Produktion von IFN- γ gibt Hinweise auf eine stabile multivalente Bindung von p60-Peptid an die antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen. Die Daten der Immunisierungsgruppe SB824(pHR261) wie auch der Gruppe SB824(pHR281) zeigen (Abbildung 21A) nur eine sehr leichte Abnahme der IFN- γ -Produktion mit Abnahme der Peptid-Menge. Bei beiden Immunisierungsgruppen konnte eine Stimulierung bis zu einer Peptidkonzentration von 10⁻¹¹ Molar nachgewiesen werden. Ab einer Molarität von 10⁻¹² war keine signifikante IFN- γ -Produktion mehr zu messen. In Abbildung 21B ist zu erkennen, dass beide Immunisierungsgruppen antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen mit hoher Avidität generieren. Allerdings zeigt der Verlauf der IFN- γ -Sekretionsrate ein unterschiedliches Verhalten. Um die Aviditätsaktivität darzustellen, wurde der EC₅₀ berechnet. Dieser Wert gibt die effektive Peptidkonzentration an, bei der 50 % der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Lage sind IFN- γ zu produzieren. Es zeigte sich, dass die EC₅₀ der beiden Immunisierungsgruppen um eine log-Stufe variiert: SB824(pHR261) hat einen EC₅₀-Wert von 1,93 x 10⁻¹⁰ und SB824(pHR281) von 5,37 x 10⁻¹¹. Dieses Ergebnis weist auf ein erstes Unterscheidungsmerkmal zwischen Gruppe 1 und 2 hin.

A)



B)

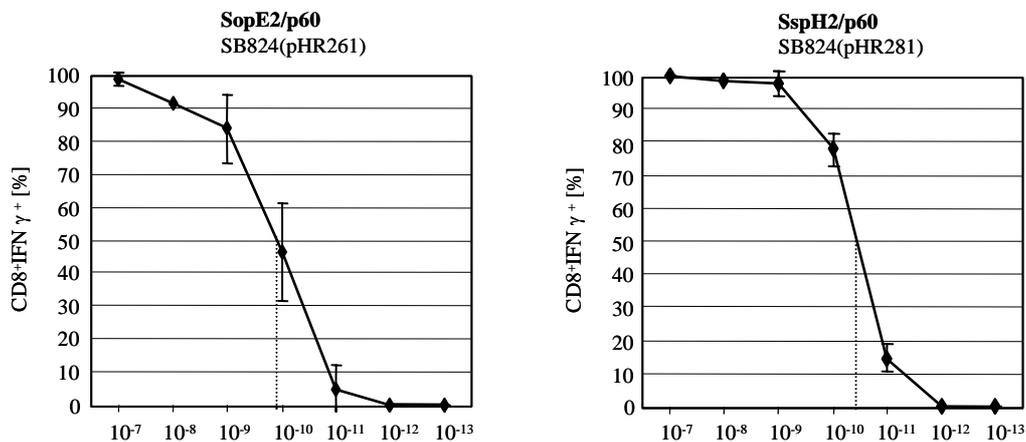


Abbildung 21: In vitro Aviditätstest. BALB/c Mäuse wurden oral mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) immunisiert. Die isolierten Milzzellen wurden mit p60₂₁₇₋₂₂₅ Peptid in verschiedenen Molaritäten für 5 h inkubiert. Die Oberfläche der Zellen wurde mit anti-CD8 α und anti-CD62L gefärbt, die intrazelluläre Färbung wurde mit anti-IFN- γ durchgeführt. (A) In den *contour plots* ist die prozentuale IFN- γ -Frequenz der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen dargestellt. (B) Das Diagramm zeigt die Avidität (als prozentualen Anteil von IFN- γ ⁺) der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen pro Verdünnungsstufe des Peptids in Molar (n = 10 Mäuse/Gruppe).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendung von *S. typhimurium* als Lebendvakzine im Mausmodell untersucht. Hierfür wurden rekombinante Salmonellen hergestellt die SPI1- bzw. SPI2-Hybridproteine, bestehend aus *Salmonella*-Effektorproteinen und dem heterologen Antigen p60, T3SS-abhängig in das Zytosol von APCs translozieren und zur Induktion zellulärer Immunantworten führen (Panthel *et al.*, 2005; Rüssmann *et al.*, 2001). Nach oraler Immunisierung mit den rekombinanten Salmonellen, die SopE2/p60 bzw. SspH2/p60 exprimieren, wurde ermittelt, ob die induzierte zelluläre Immunantwort Mäuse vor einer Infektion mit dem fakultativ intrazellulären Bakterium *L. monocytogenes* schützen kann.

Zur Entwicklung einer erfolgreichen Vakzine muss eine vermittelte Schutzantwort gut charakterisiert sein, um den Impfstoff gegebenenfalls zu optimieren. Aus diesem Grund wurden die durch die orale Immunisierung mit *S. typhimurium* induzierten CD8⁺ T-Zellantworten eingehend untersucht.

4.1 Generierung p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach oraler Immunisierung mit *S. typhimurium*

Um zu überprüfen, ob die hergestellten rekombinanten Salmonellen SB824(pHR261) und SB824(pHR281) in der Lage sind, CD8⁺ T-Zellantworten zu induzieren, wurde zunächst die erfolgreiche Expression der p60-Hybridproteine im Immunoblot überprüft. Des Weiteren zeigte die Infektion von Makrophagen mit rekombinanten Salmonellen im Immunoblot deutlich, dass die SPI1- und SPI2-Fusionsproteine zu verschiedenen Zeitpunkten während des bakteriellen Infektionsverlaufes transloziert werden. Das Fusionsprotein SopE2/p60 wurde zu frühen Zeitpunkten in der zytosolischen Fraktion detektiert (2 h und 6 h), jedoch nicht mehr nach 24 h. Das chimäre Protein SspH2/p60 wurde hingegen erst nach 6 h detektiert, war jedoch auch noch nach 24 h detektierbar. Darüber hinaus ist bekannt, dass die SPI2-Effektorproteine während des intrazellulären Überlebens von *S. typhimurium*, d.h. über Tage bis Wochen, exprimiert und zytosolisch deponiert werden (Hensel *et al.*, 1998). Die erwartete sequentielle Translokation der SPI1- bzw. SPI2-Fusionsproteine konnte somit eindeutig demonstriert werden.

Zur Induktion einer zellulären Immunantwort muss die naive T-Zelle ausreichend aktiviert werden, so dass es zu einer CD8⁺ T-Zellexpansion und nachfolgender Differenzierung kommt. Für eine effiziente Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen werden zwei Signale benötigt: das

TCR-Signal (Signal 1) und ein Signal, das durch kostimulatorische Moleküle vermittelt wird (Signal 2). CD8⁺ T-Zellen erkennen über den TCR die auf der Oberfläche von APCs präsentierten MHC-Klasse I-Peptidkomplexe (Signal 1). Eine stabile Bindung der T-Zelle an die APC führt anschließend zu einer Aktivierung der kostimulatorischen Moleküle (Signal 2) (Davis *et al.*, 1998; Germain, 1994). Eine erfolgreiche Antigenpräsentation ist demnach ausschlaggebend für die Generierung einer antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellantwort. Die Frage, inwieweit die CD8⁺ T-Zellexpansion von der Antigenmenge und der Dauer der Antigenpräsentation beeinflusst wird, wurde von vielen Arbeitsgruppen eingehend untersucht (Badovinac und Harty, 2006). Aktuelle Forschungsergebnisse weisen daraufhin, dass ein kritisches Zeitfenster existiert, wie lange eine Infektion dauern bzw. das Antigen existent sein muss, um eine vollständige CD8⁺ T-Zellantwort zu generieren (Badovinac *et al.*, 2002; Badovinac und Harty, 2002). Bei *Listeria*-Infektionen sind 24 h Antigen-Stimulierung vollkommen ausreichend, um die klonale Expansion, die mit Bildung der Gedächtniszellen einhergeht, zu induzieren (Kaech und Ahmed, 2001; Masopust *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen wurden bezüglich der Annahme durchgeführt, dass ausschließlich die Initialdosis an Antigen, jedoch nicht die Dauer des Vorhandenseins des Antigens das Ausmaß der CD8⁺ T-Zellexpansion bestimmt (Badovinac *et al.*, 2002; Kaech und Ahmed, 2001; Mercado *et al.*, 2000). Wurde der Aktivierungsprozess erfolgreich induziert, ist die weitere T-Zelldifferenzierung unabhängig von der Antigen-Quantität und -Stabilität (Busch *et al.*, 1998; Wong und Pamer, 2001).

Es stellte sich die Frage, ob die sequentielle Translokation der p60-Fusionsproteine, d.h. eine frühe/kurze Antigenpräsentation mittels SopE2/p60 bzw. eine späte/lange Antigenpräsentation mittels SspH2/p60, Auswirkungen auf die CD8⁺ T-Zellinduktion im oralen Immunisierungsmodell hat. Die Generierung von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen nach oraler Immunisierung von BALB/c-Mäusen wurde über das immundominante Listerien-Epitop p60₂₁₇₋₂₂₅ gemessen. Im ELISPOT konnte gezeigt werden, dass nach Immunisierung mit Gruppe 1 bzw. Gruppe 2 die Mäuse antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen generieren. Das Zeitfenster des Antigen-Kontaktes mit den T-Zellen scheint demnach ausreichend lang zu sein, um eine hohe Anzahl an p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu induzieren.

Die Vermutung liegt nahe, dass die präsentierte Antigenmenge bei den beiden Lebendvektoren ähnlich hoch ist, da die Anzahl der generierten CD8⁺ T-Zellen bei SB824(pHR261) und SB824(pHR281) vergleichbar ist.

Um die Effizienz der beiden Lebendvektoren als Vakzine zu testen, wurden immunisierte Mäuse mit Wildtyp *L. monocytogenes* infiziert. Es zeigte sich, dass die mit SB824(pHR261)

bzw. SB824(pHR281) immunisierten Gruppen unterschiedlich auf die Infektion reagierten. Die vakzinierten Mäuse aus ersterer Gruppe waren vor der Listerien-Infektion nicht geschützt, die Tiere der zweiten Gruppe waren hingegen vollständig geschützt, vergleichbar mit den *Listeria*-immunisierten Mäusen (Kontrollgruppe). Obwohl in den mit rekombinanten Salmonellen immunisierten Mäusen kein signifikanter Unterschied in der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellzahl im ELISPOT festgestellt werden konnte, zeigten sich derart unterschiedliche Schutzraten.

Die Infektion von Mäusen mit *L. monocytogenes* ist ein gut etabliertes Modell für die Analyse von erworbener Immunität gegen intrazelluläre Bakterien (Kaufmann, 1993). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die *Listeria*-Infektion eine beachtenswerte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort induziert (Busch *et al.*, 1998; Kursar *et al.*, 2002; Mittrucker *et al.*, 2002), wobei die CD8⁺ T-Zellpopulation die wichtigste Rolle bei der Schutzvermittlung während einer Reinfektion spielt (Kaufmann, 1993; Ladel *et al.*, 1994). Allerdings zeigte sich, dass die CD4⁺ T-Zellen während des Priming benötigt werden. Generierte CD8⁺ T-Gedächtniszellen ohne CD4⁺ T-Zellhilfe teilen sich nach Reinfektion weniger häufig, produzieren weniger IFN- γ und sind nicht in der Lage, einen vollkommenen Schutz gegen den pathogenen Erreger zu vermitteln (Bourgeois *et al.*, 2002; Janssen *et al.*, 2003; Shedlock und Shen, 2003; Sun und Bevan, 2003). Es scheint, dass die generierten CD8⁺ T-Gedächtniszellen ohne CD4⁺-Hilfe qualitative Unterschiede aufweisen (Huster *et al.*, 2004), so dass es bei einer Zweitinfektion zu keiner optimalen CD8⁺ T-Zellantwort kommt.

Diese Daten könnten zu der Vermutung führen, dass die im ELISPOT nachgewiesenen induzierten antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen bei den mit SB824(pHR281) immunisierten Mäusen eine Rolle bei der Protektion spielen, da durch die Immunisierung mit SB824(pHR261) keine CD4⁺ T-Zellen generiert wurden (Panthel *et al.*, 2005). Um zu überprüfen, welchen Anteil die CD4⁺ T-Zellpopulation bei der Schutzvermittlung hat, wurde eine weitere Infektion mit einem *Listeria*-Mutantenstamm *Listeria* 217Ser durchgeführt (Sijts *et al.*, 1997). Bei dieser Belastungsinfektion zeigte sich, dass die mit Gruppe 1 wie auch mit Gruppe 2 immunisierten Mäuse nicht geschützt waren, d.h. in dem *Salmonella*-Immunisierungsmodell tragen die CD4⁺ T-Zellen nicht zum Schutz bei. Dies bestätigt Untersuchungen, die gezeigt haben, dass hauptsächlich die CD8⁺ T-Zellantwort den Schutz vor Listerien-Infektionen vermittelt (Ladel *et al.*, 1994; Wong und Pamer, 2003). Aufgrund dieser Erkenntnisse bezogen sich die weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit auf die induzierte CD8⁺ T-Zellpopulation, deren funktionelle und phänotypische Eigenschaften eingehend analysiert wurden.

Da sich bei den ELISPOT-Daten die ermittelte Zellzahl ausschließlich auf unseparierte Milzzellen beziehen lässt, wurden MHC-Klasse I-Tetramere verwendet, um die *in vivo* vorkommenden CD8⁺ T-Zellantworten ohne weitere Manipulation in den Organen zu messen. Dabei wurde nochmals deutlich, dass der antigene Stimulus, der nötig ist, um die Expansion der CD8⁺ T-Zellen zu induzieren, in den beiden Immunisierungsgruppen SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) sehr ähnlich sein muss, da die absolute Zellzahl an generierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen keinen signifikanten Unterschied aufwies. Darüber hinaus wurde das p60₂₁₇₋₂₂₅-Tetramer dafür verwendet, um die spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten zu verschiedenen Zeitpunkten nach oraler Immunisierung zu messen. Hierbei zeigte sich, dass die Kinetik der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellantwort bei beiden Gruppen gleich war.

Die Frequenzen der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milz wiesen bei beiden Immunisierungsgruppen an Tag 14 nach Immunisierung ihre maximale Antwort auf. An Tag sieben nach Immunisierung war keine nennenswerte Frequenz messbar. Dies zeigt den unterschiedlichen Verlauf der Salmonellen-Infektion zu Listerien- (Busch und Pamer, 1999) und LCMV-Infektionen (Bachmann *et al.*, 2006), die bereits am Tag sieben bzw. acht die höchsten T-Zellfrequenzen zeigen. Die verzögerte CTL-Antwort nach Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Infektionsrouten von *S. typhimurium* (orale Gabe) und *L. monocytogenes* (i.v.-Applikation) zurückzuführen, jedoch auch mit dem unterschiedlichen Infektionsverlauf der beiden Bakterienstämme zu erklären. Die Listerien-Infektion erreicht am Tag drei ihren Höhepunkt (maximale Kolonisierung in der Milz), am Tag sieben sind die Bakterien vollständig eliminiert. Dies bedeutet, dass die maximale CTL-Antwort mit dem Zeitpunkt der vollständigen *Listeria*-Eliminierung korreliert (Busch *et al.*, 1998).

Nach oraler Immunisierung mit Salmonellen sind diese ab Tag sieben in der Milz nachweisbar (Domenech *et al.*, 2005), am Tag 14 haben sie ihr Kolonisierungsmaximum erreicht (Dunstan *et al.*, 1998). Am Tag 21 nach Immunisierung hat die Bakterienzahl in der Milz wieder abgenommen (Schmidt und Hensel, 2004). Die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen haben am Tag 14 bei beiden Immunisierungstämmen die höchste Frequenz in der Milz, d.h. zum gleichen Zeitpunkt der maximalen Kolonisierung. Demzufolge korreliert bei der *Salmonella*-Infektion der Zeitpunkt der maximalen CTL-Antwort mit der maximalen Anzahl an Salmonellen in der Milz.

Nach Tag 28 konnten keine Salmonellen mehr aus der Milz reisoliert werden, auch die CD8⁺Tetramer⁺-Frequenz hatte zu diesem Zeitpunkt wieder abgenommen. Dieser Verlauf weist darauf hin, dass der Stimulus für die T-Zellexpansion vom Infektionsverlauf der

Salmonellen abhängt. Die länger andauernde Antigenexposition bei den Mäusen, die mit SB824(pHR281) immunisiert worden waren, scheint jedoch keine Rolle zu spielen.

Die Kinetik einer Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellexpansion hängt nicht von der Dauer oder Stärke der Infektion ab (Mercado *et al.*, 2000). Des Weiteren stimmt diese Aussage mit den Beobachtungen überein, dass bei Listerien-Infektionen die T-Zellexpansion nach einer initialen Aktivierung unabhängig von der Antigenmenge und -präsenz ist (Badovinac und Harty, 2006; Mercado *et al.*, 2000; Wong und Pamer, 2001). Zusammenfassend lassen diese Daten die Vermutung zu, dass die Dauer der Antigenpräsenz bei der Immunisierung mit *S. typhimurium* ebenfalls keinen Einfluss auf die T-Zellexpansion hat, da kein Unterschied zwischen SB824(pHR261) und SB824(pHR281) zu beobachten war.

4.2 Effektorfunktion der generierten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen

Es stellte sich die Frage, ob die generierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den beiden Immunisierungsgruppen funktionell sind, d.h. in der Lage sind IFN- γ zu produzieren. Um die Zytokinexpression in den immunisierten Mäusen zu untersuchen, wurden mit den isolierten Milzzellen intrazelluläre Färbungen durchgeführt und zur näheren Charakterisierung der Zellen wurde simultan mit Oberflächenmarkern gefärbt. In den aktivierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺CD62L^{low}) der immunisierten Mäuse von Gruppe 1 bzw. Gruppe 2 konnte eine vergleichbare IFN- γ -Produktion festgestellt werden. Betrachtet man die Absolutzahlen, ist kein signifikanter Unterschied in der IFN- γ -Frequenz zwischen den beiden Immunisierungsgruppen zu messen. Der Vergleich der IFN- γ -Zellzahl mit der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen Tetramer-Zellzahl zeigte eine Korrelation der Frequenzen, d.h. alle generierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen waren in der Lage IFN- γ zu sekretieren.

Um weiteren Aufschluss über die tatsächliche Aktivität der induzierten antigenspezifischen CTLs zu gewinnen, wurde deren Funktionalität mit Hilfe des *in vivo* Zytotoxizitätsassays überprüft. Hier zeigte sich schon nach 5 h eine relativ hohe Lysekapazität beider Immunisierungsgruppen. Diese schnelle, direkte Zytotoxizität deutet auf sofort verfügbare Effektormoleküle wie beispielsweise Granzym B und Perforin hin, die in zytotoxischen Granulae gespeichert werden. Die Synthese dieser Effektormoleküle wird mit erstem Antigenkontakt initiiert bzw. die Effektormoleküle sind in den Zellen reichlich vorhanden, die als letztes Antigenkontakt hatten (Wolint *et al.*, 2004). Diese Erkenntnisse weisen auf einen sehr gut differenzierten Effektorzellsubtyp hin (Bachmann *et al.*, 2005), der durch die

Immunisierung mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) ein sehr starkes Aktivierungssignal erhalten hatte. Die lytische Aktivität der Gruppe 2 wird nach 20 h zu fast 100% induziert, was das Ergebnis der Schutzvermittlung vor *L. monocytogenes* widerspiegelt. Auch die immunisierte Gruppe 1 zeigte eine relativ hohe Lyseaktivität von 66%, aufgrund der Schwankungen in dieser Gruppe ist kein signifikanter Unterschied zu der Immunisierungsgruppe 2 berechnet. Diese starke Lyseaktivität der Gruppe 1 entspricht allerdings nicht dem Ergebnis der Belastungsinfektion, da die Mäuse nicht vor der *Listeria*-Infektion geschützt waren. Trotzdem bestätigen diese Ergebnisse eindeutig die Funktionalität der induzierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit SB824(pHR261). Die Unfähigkeit dieser generierten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen, trotz guter Lyseaktivität, die Listerien-Infektion zu eliminieren, kann eventuell mit der hohen Infektionsdosis erklärt werden. Anfänglich sind die vorhandenen antigenspezifischen CTLs in der Lage, mit der Infektion zurechtzukommen, da sie eine schnelle Effektorfunktion vorweisen können. Der 5 h-Wert zeigte zwar keinen signifikanten Unterschied in der Lyseaktivität zwischen den beiden Immunisierungsgruppen, gibt allerdings Hinweise auf eine schneller induzierte Zytotoxizität bei der SB824(pHR281)-immunisierten Gruppe, da die Lyserate höher ist. Dies würde bedeuten, dass die induzierten CD8⁺ T-Zellen von Gruppe 2 bei der Listerien-Infektion sehr schnell zu einem sehr frühen Zeitpunkt die Zahl der Listerien eliminieren konnten, so dass eine bakterielle Ausbreitung von Anfang an sehr stark unterbunden wurde. Bei der statisch festgelegten Menge der zu eliminierenden p60₂₁₇₋₂₂₅-beladenen Milzzellen im Zytotoxizitätsassay spielt die Geschwindigkeit der Eliminierung eine untergeordnete Rolle, im Gegensatz zu der bakteriellen Infektion mit sich vermehrenden Bakterien.

Die Bekämpfung einer Infektion hängt außerdem entscheidend von der Antigenmenge bzw. Infektionsdosis ab, so dass eine hohe Dosis, wie sie die *Listeria*-Infektion darstellt, nur mit Hilfe von Gedächtniszellen und deren Proliferationskapazität und Effektorfunktion bekämpft werden kann (Badovinac und Harty, 2006). Es stellte sich demnach die Frage, inwieweit die beiden Lebendvakzine SB824(pHR261) und SB824(pHR281) in der Lage sind, p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische Gedächtniszellen zu induzieren. Eine unterschiedliche Gedächtniszellentwicklung bezüglich der antigenspezifischen T_{EM} und T_{ZM} könnte ein Hinweis auf die fehlende Protektion bei der Immunisierung mit SB824(pHR261) sein. Des Weiteren wäre vorstellbar, dass die Restimulierung generierter p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺-Gedächtniszellen bei Gruppe 1 nicht ausreichend schnell und massiv ist, um die anhaltend größer werdende Menge an *L. monocytogenes* in der Maus zu eliminieren.

4.3 Charakterisierung der induzierten CD8⁺ T-Zellsubpopulationen

Aktuelle Ergebnisse zeigen deutlich, dass unter anderem die Expression des Oberflächenmarkers CD127 für die Existenz antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen als langlebende Gedächtniszellen eine wichtige Rolle spielt (Huster *et al.*, 2004; Kaech *et al.*, 2003). Die Arbeitsgruppe Oxenius konnte überdies analysieren, dass eine verschieden starke Antigenpräsenz zu einer unterschiedlichen Entwicklung bezüglich der drei CD8⁺ T-Zellsubpopulationen führt (Bachmann *et al.*, 2005), die durch die Oberflächenmarker CD127 und CD62L charakterisiert werden können. Da bei der Immunisierung mit SB824(pHR261) und SB824(pHR281) eine unterschiedlich lange Antigenpräsentation festgestellt werden konnte, könnte eine dadurch bedingte abweichende Verteilung der drei Subpopulationen bei Gruppe 1 und Gruppe 2 eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Schutzverhalten sein. Die Ergebnisse der Schutzexperimente könnten demnach einen Hinweis darauf geben, dass die Antigen-Persistenz Einfluss auf die relative Verteilung der CD8⁺ Gedächtniszell-Subpopulationen hat. Es konnte gezeigt werden, dass eine schwache Antigen dosis nur zu einer kurzen Aufrechterhaltung von einer antigenspezifischen T_E-Population führt, hingegen ein deutlicher Anteil an T_{EM} und T_{ZM} zu erkennen ist, wobei der T_{ZM}-Anteil über einen längeren Zeitraum stabil bleibt als der T_{EM}-Anteil. Eine niedrige Antigen dosis, allerdings mit langer Präsenz, führt hingegen zu einer anhaltend stabilen Verteilung aller drei Subpopulationen, wobei die T_E-Population den größten Anteil erreicht. Eine hohe und persistente Antigen-Dosis induziert einen sehr hohen T_E-Anteil der für einen langen Zeitraum aufrechterhalten bleibt (85% an Tag 110 nach Infektion), jedoch kommt es zu keiner Differenzierung in T_{EM} oder T_{ZM} (Bachmann *et al.*, 2005). Diese Daten führten zu der Vermutung, dass die Immunisierung mit SB824(pHR261) eventuell dem Differenzierungsmodell entspricht, das bei der Infektion mit einer schwachen Antigen dosis zu sehen ist, da das p60₂₁₇₋₂₂₅-Antigen nur zu Beginn der *Salmonella*-Infektion präsentiert wird. Die Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen nach der Immunisierung mit SB824(pHR281) hingegen könnte eventuell dem Modell zugeordnet werden, bei dem drei stabile Subpopulationen entstehen. Das p60₂₁₇₋₂₂₅-Antigen bei dieser Immunisierung ist für einen längeren Zeitraum präsent, d.h. ab dem Zeitpunkt des intrazellulären Überlebens von *S. typhimurium*.

Die Oxenius-Gruppe konnte außerdem zeigen, dass je nach Infektionsart T_{ZM} oder T_{EM} Schutz vermitteln. Bei sich schnell vermehrenden peripheren viralen Infektionen, wie z.B. Influenzavirus oder Sendai Virus, hängt eine erfolgreiche Eliminierung ausschließlich von der Anwesenheit einer genügend hohen Anzahl an antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen in

peripherem Geweben ab, d.h. von der T_E- und T_{EM}-Population (Bachmann *et al.*, 2005; Cerwenka *et al.*, 1999; Ely *et al.*, 2003; Hogan *et al.*, 2001). Bei einer systemischen Infektion hingegen oder Infektionen mit langsam replizierenden Erregern, wie z.B. LCMV, vermittelt die proliferierende T_{ZM}-Population Schutz (Bachmann *et al.*, 2005; Hogan *et al.*, 2001; Wherry *et al.*, 2003; Zaph *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse sind allerdings nicht auf eine systemische Listerien-Infektion im Mausmodell übertragbar, bei der die T_{EM} die schützende Population zu sein scheint (Huster *et al.*, 2006). Infektionen mit *heat-killed L. monocytogenes* (HKL) induzieren antigenspezifische CD8⁺ T-Zellantworten, deren absolute Zellzahlen vergleichbar sind mit denen nach einer Wildtyp-Infektion. Darüber hinaus sind diese antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Lage IFN- γ zu sekretieren und weisen nach einer Belastungsinfektion eine starke Expansion auf. Trotz dieser Eigenschaften besitzt eine HKL-immunisierte Maus keinen Schutz vor einer Listerien-Wildtypinfektion. Es konnte gezeigt werden, dass durch die HKL-Infektion ausschließlich T_{ZM} generiert werden. Dies führte zu dem Schluss, dass die wichtigste schützende Subpopulation bei einer Listerien-Infektion die T_{EM}-Population ist (Huster *et al.*, 2006; Lauvau *et al.*, 2001). Diese Studien führten zu der Frage, ob die Immunisierung mit SB824(pHR261) eventuell keine T_{EM}-Population induziert bzw. die Menge der generierten T_{EM} nicht ausreichend groß ist, um vor einer letalen Listerien-Infektion schützen zu können.

Auf Grund dieser Daten wurden die Milzzellen nach Immunisierung mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) mit Hilfe der beiden Oberflächenmarker CD62L und CD127 näher untersucht. Da der Verlauf der T-Zelldifferenzierung eventuell Aufschluss über eine zeitlich unterschiedliche Gedächtniszell-Entwicklung bei den beiden Immunisierungsgruppen geben könnte, wurde zusätzlich eine Kinetik durchgeführt, bei der die CD127-Expression Aufschluss über die Differenzierung geben sollte. Die CD127-Expression ist schon während der akuten Priming-Phase notwendig, um das Überleben der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen zu ermöglichen (Bachmann *et al.*, 2006).

Da die Milz vermutlich nicht das alleinige repräsentative Organ für generierte CD8⁺ T-Gedächtniszellen ist, da bestimmte Zell-Subpopulationen in der Lage sind, in weitere lymphatische und nicht-lymphatische Organe zu migrieren und dort zu verbleiben, wurden neben der Milz auch Lunge und Lymphknoten bezüglich der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellsubpopulationen untersucht.

Beide *Salmonella*-Lebendvakzine sind in der Lage, sowohl eine antigenspezifische T_{EM}- als auch T_{ZM}-Population zu generieren. Bezüglich der unterschiedlich langen Antigenpräsenz bei Gruppe 1 bzw. Gruppe 2 ergaben sich in der Verteilung der drei Subpopulationen keine

signifikanten Abweichungen. Auch die Kinetik-Studie ergab, dass zwischen der Immunisierung mit SB824(pHR261) und SB824(pHR281) in allen drei untersuchten Organen keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung und der Menge der drei Subpopulationen existieren, jedoch auch kein identischer Verlauf der Differenzierung vorliegt.

Ähnliche Ergebnisse, wie sie in der Arbeitsgruppe Oxenius aufgrund verschieden langer Antigenpräsenz beobachtet wurden, können nicht bestätigt werden. Allerdings ist bei der Immunisierung mit SB824(pHR281) in der relativen Verteilung tendenziell in allen Organen ein leicht erhöhter Anteil der T_E-Population im Vergleich zu Gruppe 2 zu sehen, der jedoch statistisch nicht signifikant ist. Dieser Unterschied ist auf die starke Reduktion der T_E-Menge in der Milz nach vier Wochen bei Gruppe 1 zurückzuführen, was ein deutlicher Hinweis auf die Antigen-Abhängigkeit der Expansionshöhe ist (Prlic *et al.*, 2006). Die Antigenpräsenz bei Gruppe 1 ist wesentlich kürzer als bei Gruppe 2, somit kann vermutet werden, dass hier die CD127-Expression früher wieder aktiviert wird. Die Stabilität der beiden Gedächtniszellpopulationen lässt ebenfalls keinen Unterschied zwischen den beiden Immunisierungsgruppen erkennen. Die Verteilung von T_{EM} und T_{ZM} ist ebenso sehr ähnlich zwischen Gruppe 1 und 2, der T_{ZM}-Anteil ist in beiden Gruppen in Milz und Lymphknoten höher als der T_{EM}-Anteil. Dies bestätigt das Ergebnis, dass die Antigendauer ausschließlich die Expansionsmenge beeinflussen kann, jedoch weder Einfluss auf die Funktion noch auf die Entwicklung der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen hat (Prlic *et al.*, 2006). Zusammenfassend bedeuten diese Ergebnisse, dass im oralen Vakzinierungsmodell mit *S. typhimurium* eine kurze Antigenpräsentation, wie sie bei der Immunisierung mit SB824(pHR261) stattfindet, ausreicht, um die Gedächtniszell-Entwicklung vollständig zu induzieren. Somit ist anzunehmen, dass die Differenzierung der Gedächtniszellen nach oraler Immunisierung mit *S. typhimurium* zu einem frühen Zeitpunkt nach Immunisierung beginnt. Dies ist vergleichbar mit den Daten der T-Zelldifferenzierung im *Listeria*- und LCMV-Infektionsmodell. Hier wird innerhalb von 24 h nach Infektion die Programmierung der Gedächtniszellentwicklung induziert (Huster *et al.*, 2004; Kaech *et al.*, 2003).

Der Differenzierungsweg der Gedächtniszellen wird in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert. Es existiert das lineare und progressive Differenzierungsmodell. Ersteres geht von einem kontinuierlichen Verlauf von der naiven CD8⁺ T-Zelle zu T_E über T_{EM} zu T_{ZM} aus (Bouneaud *et al.*, 2005; Wherry *et al.*, 2003). Sallusto und Lanzavecchia konnten für die humane Gedächtniszellentwicklung zeigen, dass T_{ZM} die Quelle für T_{EM} und T_E ist, was der Hypothese des progressiven Modells im murinen System gleichkommt (Sallusto *et al.*, 1999). Es zeigte sich, dass nach Stimulierung die CD127-Expression der naiven CD8⁺ T-Zellen stark

reduziert wird und eine sog. intermediäre Population entsteht, die vorübergehend kein CD127 exprimieren, aus der jedoch direkt Gedächtniszellen entstehen können, ohne dass vorher eine Umwandlung in T_E stattfinden muss (Bachmann *et al.*, 2005; Huster *et al.*, 2006). Da bei der Immunisierung mit den beiden *Salmonella*-Lebendvakzinen zu einem relativ frühen Zeitpunkt (zwei Wochen nach Immunisierung) ein sehr hoher Anteil an T_{ZM} vorliegt und auch die T_{EM} -Population deutlich nachweisbar ist, ist anzunehmen, dass hier ebenfalls das progressive Differenzierungsmodell vorliegt.

Die beiden relevanten Gedächtniszell-Populationen, die bei der Schutzvermittlung nachweislich eine Rolle spielen, liegen in beiden Immunisierungsgruppen SB824(pHR261) und SB824(pHR281) in etwa gleichen Anteilen vor. Das heißt, das unterschiedliche Schutzverhalten bei der *Listeria*-Infektion nach Immunisierung mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) konnte somit nicht auf eine fehlende T_{EM} - bzw. T_{ZM} -Population bei Gruppe 1 zurückgeführt werden.

4.4 Funktionelle Analyse der $CD8^+$ T-Zellsubpopulationen

Die nächste Überlegung, welcher Mechanismus für die unterschiedlichen Schutzraten in beiden Immunisierungsgruppen verantwortlich sein könnte, führte zu der Untersuchung des Proliferationsvermögens der T_{ZM} -Population. Es sollte ausgeschlossen werden, dass der fehlende Schutz bei der Immunisierung mit SB824(pHR261) eventuell auf eine nicht ausreichend gute Proliferation zurückzuführen ist.

Es zeigte sich, dass beide Immunisierungsgruppen eine hohe Proliferation vorweisen konnten. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass das unterschiedliche Schutzverhalten nicht aufgrund einer fehlerhaften Proliferation vorliegt, da die Proliferationskapazität des nicht-schützenden Impfstammes SB824(pHR261) sogar etwas höher war als von SB824(pHR281). Die leicht geringere Proliferationsrate der Gruppe 2 ist aber konform mit der Verteilung der beiden Gedächtnissubpopulationen in dieser Gruppe. In Gruppe 2 war eine etwas höhere Anzahl an T_E und T_{EM} nachzuweisen als in Gruppe 1, somit mussten zur Bekämpfung der *Listeria*-Infektion weniger T_{ZM} herangezogen werden. Folglich ist auch zu erklären, dass bei Gruppe 2 noch ein Teil der T_{ZM} nach Infektion existiert. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die generierten $CD8^+$ -Gedächtniszellen beider Lebendvakzine eine hervorragende Proliferationsqualität aufweisen, d.h. auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Immunisierungsgruppen gemessen werden, der Hinweise auf die unterschiedliche Schutzvermittlung liefern könnte.

Diese Ergebnisse ließen demnach weiterhin die Frage offen, welche Faktoren für das unterschiedliche Schutzverhalten verantwortlich sind.

Daraufhin wurde die Avidität der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu dem Peptid/MHC-Klasse I-Komplex untersucht. T-Zellen zeigen charakteristische antigen-abhängige Reaktionen, die als funktionelle Avidität bezeichnet werden und durch die Aktivierung von Effektorfunktionen gemessen werden (Yip *et al.*, 1999). Es ist außerdem bekannt, dass unterschiedliche Antworten der T-Zellen bezüglich Zytotoxizitätsvermögen, Proliferation und Zytokinproduktion durch unterschiedliche Aktivierungsgrenzwerte der T-Zellen erreicht werden können (Itoh und Germain, 1997). Das heißt, unterschiedliche Funktionen und demzufolge unterschiedliche Antworten von T-Zellen, können auf eine unterschiedliche funktionelle Avidität zurückgeführt werden (Hesse *et al.*, 2001).

Generell wird die T-Zellavidität aufgrund einer Anzahl von Komponenten festgelegt. Unter anderem ist dies die intrinsische TCR-Affinität für den Peptid/MHC-Komplex. Darüber hinaus spielt die Expressionsstärke des TCR und der kostimulatorischen Moleküle, sowie die unterschiedliche membranöse Anhäufung der relevanten Rezeptoren eine Rolle (Fahmy *et al.*, 2001; Mallone *et al.*, 2005). Die Menge an Antigen, die benötigt wird, um eine Effektorfunktion zu induzieren, ist somit eine Reflektion der funktionellen Avidität einer CTL. Hoch-avide CTLs reagieren auf relativ geringe Mengen an MHC-Klasse I präsentierten Peptiden, wohingegen niedrig-avide CTLs eine wesentlich höhere Menge an Peptid/MHC-Klasse I-Komplexen benötigen. Die durch die Immunisierung mit SB824(pHR261) bzw. SB824(pHR281) induzierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen können jeweils als hoch-avide CTLs eingestuft werden, da sie nur eine sehr geringe Peptidkonzentration benötigen (10^{-11} Molar), um IFN- γ zu produzieren. Allerdings unterscheidet sich der Wert der Peptidkonzentration, der bei 50% der antigenspezifischen CTLs die Sekretion von IFN- γ bewirkt (EC_{50}), zwischen den beiden Immunisierungsgruppen um den Faktor 10. Diese Differenz könnte entscheidend für das unterschiedliche Schutzverhalten der beiden Gruppen sein. Die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, die durch die Immunisierung mit SB824(pHR281) generiert werden, benötigen demnach eine geringere Anzahl an Peptid/MHC-Klasse I-Komplexen, um aktiviert zu werden. Dies bedeutet, sie sind schneller in der Lage, an die Zielzellen zu binden und diese zu lysieren. Dieses Ergebnis spiegelt auch die Werte des Zytotoxizitätsassays wider. Wie oben schon diskutiert, gab die ermittelte Lyseaktivität Hinweise auf eine schneller induzierte Zytotoxizität bei der mit SB824(pHR281)-immunisierten Gruppe, da die Lyserate hier höher war. Dies könnte eine

mögliche Erklärung für die unterschiedliche Schutzvermittlung nach Immunisierung mit den beiden Impfstämmen sein.

5 Zusammenfassung

CD8⁺ T-Zellen spielen bei der Vermittlung von Protektion gegenüber intrazellulären Krankheitserregern eine entscheidende Rolle. Um einen langanhaltenden Schutz durch einen Impfstoff zu erzielen, muss dieser CD8⁺-Gedächtniszellen induzieren. Virulenzabgeschwächte Bakterien, die heterologe Antigene exprimieren, sind in der Lage, nach oraler Immunisierung komplexe T-Zellantworten zu stimulieren. Als besonders vielversprechende bakterielle Lebendvektoren für Menschen und Nutztiere haben sich attenuierte Salmonellen erwiesen. Salmonellen verfügen über ein virulenzassoziiertes Typ III-Sekretionssystem (T3SS), mit dessen Hilfe Effektormoleküle mit zellmodulatorischer Funktion durch die Wirtszellmembran direkt in das Zytosol eukaryontischer antigenpräsentierender Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) transloziert werden. Dieser Protein-Exportapparat kann dafür verwendet werden, um heterologe Antigene effizient in das Zytosol von eukaryontischen Zellen zu transportieren. Die Fremdproteine gelangen dadurch in den MHC-Klasse I-restringierten Antigen-Präsentationsweg. Diese neuartige Vakzinierungsstrategie führt im oralen Mausimmunisierungsmodell zu einer effektiven antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellantwort. *Salmonella typhimurium* verfügt über zwei T3SS, die von den *Salmonella*-Pathogenitätsinseln 1 (SPI1) und 2 (SPI2) kodiert werden. Diese beiden T3SS spielen während der *Salmonella*-Pathogenese eine unterschiedliche Rolle. Während SPI1 die initiale Invasion in eukaryontische Zellen vermittelt, ist SPI2 für die intrazelluläre Replikation und das wochenlange Überleben in der Wirtszelle sowie für die systemische Ausbreitung des Infektionserregers erforderlich. Die Genexpression und die Bildung der SPI1- und SPI2-Effektorproteine findet somit zu verschiedenen Zeitpunkten des *Salmonella*-Infektionsverlaufes statt, d.h. die entsprechenden Moleküle werden sequentiell transloziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss diese zeitlich versetzte SPI1- und SPI2-vermittelte Translokation von heterologen Fusionsproteinen auf die CD8⁺ T-Zellinduktion im Mausmodell hat. Als heterologes Modellantigen wurde das immundominante p60-Protein des intrazellulären Bakteriums *Listeria monocytogenes* gewählt. Die Mureinhydrolase p60 wurde mit dem SPI1-Effektorprotein SopE2 bzw. mit dem SPI2-Effektorprotein SspH2 fusioniert.

Zunächst konnte *in vitro* demonstriert werden, dass die beiden konstruierten Hybridproteine T3SS-abhängig durch Salmonellen in das Zytosol von infizierten Makrophagen transloziert wurden. Hierbei zeigte sich die erwartete sequentielle Translokation der chimären Proteine.

Nach einmaliger oraler Immunisierung von Mäusen mit den rekombinanten *Salmonella*-Impfstämmen wurde die Quantität der induzierten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen untersucht. Diese wurde zunächst mit Hilfe des ELISPOT-Assays analysiert, der eine effiziente CD8⁺ T-Zellgenerierung in beiden Immunisierungsgruppen zeigte. Eine weitaus sensitivere Methode zur CD8⁺ T-Zelluntersuchung, insbesondere in Bezug auf die Bestimmung der absoluten Zellzahl und auf die Antigenpezifität, stellt die Tetramer-Technologie dar. Hierbei handelt es sich um eine Methode, mit der antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen *ex vivo* analysiert werden können. Die Tetramer-Färbungen zeigten ebenfalls deutlich, dass die sequentielle Translokation der beiden Fusionsproteine keinen Einfluss auf die Quantität der induzierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen hat. Um zu überprüfen, ob diese generierten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen Schutz vor einer bakteriellen Infektion vermitteln können, wurden die immunisierten Mäuse einer letalen Belastungsinfektion mit *L. monocytogenes* ausgesetzt. Interessanterweise konnten nur die durch die Immunisierung mit dem chimären SPI2-Protein (SspH2/p60) generierten CD8⁺ T-Zellen Schutz vor einer Listerien-Infektion vermitteln. Als nächstes wurde ein *L. monocytogenes*-Mutantenstamm für ein weiteres Protektionsexperiment eingesetzt, um zu klären, ob die induzierten CD8⁺ T-Zellen für den Schutz verantwortlich sind. Dieser *L. monocytogenes*-Mutantenstamm hat einen Aminosäure-Austausch in dem immundominanten Epitop von p60 (AS217: Lysin→Serin), so dass p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen keinen Schutz vor einer Infektion mit diesem Stamm vermitteln können. Beide Immunisierungsgruppen waren nach letaler Belastungsinfektion mit dem *L. monocytogenes*-Mutantenstamm ungeschützt. Dies bedeutet, dass die induzierte CD8⁺ T-Zellpopulation für den Schutz verantwortlich sein muss. Deshalb wurden die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, die nach oraler Immunisierung mit den beiden Immunisierungsstämmen generiert wurden, eingehenden qualitativen Analysen unterzogen.

Zunächst wurde die Funktion der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen (CTLs) untersucht. Mit Hilfe von intrazellulären Zytokinfärbungen konnte gezeigt werden, dass die antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen beider Immunisierungsgruppen vergleichbare Mengen an IFN- γ sekretieren können. Des Weiteren zeigte der Zytotoxizitätsassay, dass die CTLs auch *in vivo* eine effiziente Lyseaktivität aufweisen. Dies bedeutet, dass mit beiden *Salmonella*-Lebendvakzinen funktionelle CTLs induziert werden konnten.

Überdies konnte erstmals gezeigt werden, dass durch die orale Immunisierung mit rekombinanten *Salmonellen* eine Generierung von CD8⁺-Gedächtniszellen möglich ist. Im Mausmodell konnten bislang zwei Gedächtniszellpopulationen identifiziert werden, die eine

unterschiedliche Rolle bei der Protektion spielen. Die Effektor T-Gedächtniszellpopulation (T_{EM}) besteht aus aktiven T-Zellen, die eine sofortige Effektorfunktion vermitteln können, jedoch eine geringe numerische Expansionsrate aufweisen. Bei den zentralen T-Gedächtniszellen (T_{ZM}) handelt es sich um ruhende Zelle, die aufgrund konstanter Homeostase eine lange Lebensdauer haben und eine sehr hohe Proliferationskapazität nach Antigenkontakt aufweisen. Die Diskriminierung der beiden murinen Gedächtniszell-Subpopulationen ist durch die beiden Oberflächenmarker CD127 (IL-7 Rezeptor α -Kette) und CD62L (L-Selektin) möglich. CD62L ist ein sog. *homing*-Rezeptor der eine Lokalisation der Gedächtniszellen in den Lymphknoten ermöglicht. IL-7 ist für das Überleben der Gedächtniszellen notwendig.

Durch die orale Immunisierung mit rekombinanten Salmonellen, die transloziertes SopE2/p60 oder SspH2/p60 exprimieren, wurden sowohl antigenspezifische T_{EM} als auch T_{ZM} generiert. Das Verteilungsmuster dieser Gedächtniszell-Subpopulationen und deren Entwicklungskinetik in verschiedenen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen wies in beiden Immunisierungsgruppen keine signifikanten Unterschiede auf. Des Weiteren zeigten die durch die Immunisierung mit den beiden *Salmonella*-Impfstämmen generierten antigenspezifischen T_{ZM} eine vergleichbare Proliferationskapazität nach einer *L. monocytogenes*-Infektion.

Eine weitere qualitative Untersuchung der induzierten $CD8^+$ T-Zellen erfolgte durch die Bestimmung der funktionellen Avidität. Sie spiegelt die Menge an Antigen wider, die benötigt wird, um eine CTL-Effektorfunktion zu induzieren. Die funktionellen Avidität wird über die Messung der maximalen T-Zellantwort in Form der IFN- γ -Sekretion untersucht, die je nach Peptidkonzentration unterschiedlich sein kann. Es zeigte sich, dass die funktionelle Avidität der antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen, die durch das chimäre SPI1-Protein (SopE2/p60) induziert worden waren, eine um 1 log-Stufe geringere Aktivität aufweisen, als die $CD8^+$ T-Zellen, die nach der Immunisierung mit SspH2/p60 generiert wurden. Dieser wichtige qualitative Unterschied zwischen den beiden induzierten $CD8^+$ T-Zellpopulationen könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Schutzraten vor einer Listerien-Infektion darstellen.

6 Literaturverzeichnis

Abbas, Lichtman and Pober (2000). Cellular and Molecular Immunology. 4. Auflage. W.B. Saunders Company

Abrahams, G. L. and Hensel, M. (2006) Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cell Microbiol* **8**: 728-737.

Aepfelbacher, M., Zumbihl, R., Ruckdeschel, K., Jacobi, C. A., Barz, C., and Heesemann, J. (1999) The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defense. *Biol Chem* **380**: 795-802.

Agarwal, S. and Rao, A. (1998) Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* **9**: 765-775.

Ahmed, R. and Gray, D. (1996) Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**: 54-60.

Alpuche-Aranda, C. M., Racoosin, E. L., Swanson, J. A., and Miller, S. I. (1994) *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* **179**: 601-608.

Angelakopoulos, H. and Hohmann, E. L. (2000) Pilot study of phoP/phoQ-deleted *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Infect Immun* **68**: 2135-2141.

Asseman, C. and von Herrath, M. (2002) About CD4pos CD25pos regulatory cells. *Autoimmun Rev* **1**: 190-197.

Bachmann, M. F., Beerli, R. R., Agnellini, P., Wolint, P., Schwarz, K., and Oxenius, A. (2006) Long-lived memory CD8+ T cells are programmed by prolonged antigen exposure and low levels of cellular activation. *Eur J Immunol* **36**: 842-854.

Bachmann, M. F., Hunziker, L., Zinkernagel, R. M., Storni, T., and Kopf, M. (2004) Maintenance of memory CTL responses by T helper cells and CD40-CD40 ligand: antibodies provide the key. *Eur J Immunol* **34**: 317-326.

Bachmann, M. F., Wolint, P., Schwarz, K., Jager, P., and Oxenius, A. (2005) Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J Immunol* **175**: 4686-4696.

Badovinac, V. P. and Harty, J. T. (2002) CD8(+) T-cell homeostasis after infection: setting the 'curve'. *Microbes Infect* **4**: 441-447.

Badovinac, V. P. and Harty, J. T. (2006) Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. *Immunol Rev* **211**: 67-80.

Badovinac, V. P., Porter, B. B., and Harty, J. T. (2002) Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* **3**: 619-626.

- Bakshi, C. S., Singh, V. P., Wood, M. W., Jones, P. W., Wallis, T. S., and Galyov, E. E. (2000) Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. *J Bacteriol* **182**: 2341-2344.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**: 245-252.
- Belz, G. T., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (2002) Cross-presentation of antigens by dendritic cells. *Crit Rev Immunol* **22**: 439-448.
- Bevan, M. J. (2004) Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* **4**: 595-602.
- Biron, C. A. and Gazzinelli, R. T. (1995) Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr Opin Immunol* **7**: 485-496.
- Bouneaud, C., Garcia, Z., Kourilsky, P., and Pannetier, C. (2005) Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo. *J Exp Med* **201**: 579-590.
- Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. (2002) A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* **297**: 2060-2063.
- Bradley, L. M., Haynes, L., and Swain, S. L. (2005) IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *Trends Immunol* **26**: 172-176.
- Brunt, L. M., Portnoy, D. A., and Unanue, E. R. (1990) Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8+ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. *J Immunol* **145**: 3540-3546.
- Buller, R. M., Holmes, K. L., Hugin, A., Frederickson, T. N., and Morse, H. C., III (1987) Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature* **328**: 77-79.
- Busch, D. H. and Pamer, E. G. (1999) T lymphocyte dynamics during *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol Lett* **65**: 93-98.
- Busch, D. H., Pilip, I. M., Vijn, S., and Pamer, E. G. (1998) Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* **8**: 353-362.
- Campbell, J. J., Murphy, K. E., Kunkel, E. J., Brightling, C. E., Soler, D., Shen, Z., Boisvert, J., Greenberg, H. B., Vierra, M. A., Goodman, S. B., Genovese, M. C., Wardlaw, A. J., Butcher, E. C., and Wu, L. (2001) CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* **166**: 877-884.
- Castellino, F. and Germain, R. N. (2006) Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol* **24**: 519-540.
- Cerwenka, A., Morgan, T. M., and Dutton, R. W. (1999) Naive, effector, and memory CD8 T cells in protection against pulmonary influenza virus infection: homing properties rather than initial frequencies are crucial. *J Immunol* **163**: 5535-5543.

Chatfield, S., Roberts, M., Londono, P., Cropley, I., Douce, G., and Dougan, G. (1993) The development of oral vaccines based on live attenuated *Salmonella* strains. *FEMS Immunol Med Microbiol* **7**: 1-7.

Cirillo, D. M., Valdivia, R. H., Monack, D. M., and Falkow, S. (1998) Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* **30**: 175-188.

Collazo, C. M. and Galan, J. E. (1997) The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol Microbiol* **24**: 747-756.

Constantin, C. M., Bonney, E. E., Altman, J. D., and Strickland, O. L. (2002) Major histocompatibility complex (MHC) tetramer technology: an evaluation. *Biol Res Nurs* **4**: 115-127.

Cossart, P. (2002) Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *Int J Med Microbiol* **291**: 401-409.

Davis, M. M., Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y. (1998) Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* **16**: 523-544.

Dooms, H. and Abbas, A. K. (2002) Life and death in effector T cells. *Nat Immunol* **3**: 797-798.

Dunstan, S. J., Simmons, C. P., and Strugnell, R. A. (1998) Comparison of the abilities of different attenuated *Salmonella typhimurium* strains to elicit humoral immune responses against a heterologous antigen. *Infect Immun* **66**: 732-740.

Ely, K. H., Roberts, A. D., and Woodland, D. L. (2003) Cutting edge: effector memory CD8+ T cells in the lung airways retain the potential to mediate recall responses. *J Immunol* **171**: 3338-3342.

Everest, P., Griffiths, P., and Dougan, G. (1995) Live *Salmonella* vaccines as a route towards oral immunisation. *Biologicals* **23**: 119-124.

Fahmy, T. M., Bieler, J. G., Edidin, M., and Schneck, J. P. (2001) Increased TCR avidity after T cell activation: a mechanism for sensing low-density antigen. *Immunity* **14**: 135-143.

Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W., and Hardt, W. D. (2001) SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* **276**: 34035-34040.

Fu, Y. and Galan, J. E. (1998) The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* **27**: 359-368.

Galan, J. E. (1998) Interactions of *Salmonella* with host cells: encounters of the closest kind. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14006-14008.

Galan, J. E. and Ginocchio, C. (1994) The molecular genetic bases of *Salmonella* entry into mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **22**: 301-306.

- Garvis, S. G., Beuzon, C. R., and Holden, D. W. (2001) A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages. *Cell Microbiol* **3**: 731-744.
- Geginat, J., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2003) Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* **101**: 4260-4266.
- Germain, R. N. (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**: 287-299.
- Gett, A. V., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Geginat, J. (2003) T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* **4**: 355-360.
- Gunzer, M., Schafer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zanker, K. S., Brocker, E. B., Kampgen, E., and Friedl, P. (2000) Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* **13**: 323-332.
- Hahn, H. P. and von Specht, B. U. (2003) Secretory delivery of recombinant proteins in attenuated *Salmonella* strains: potential and limitations of Type I protein transporters. *FEMS Immunol Med Microbiol* **37**: 87-98.
- Hansen-Wester, I. and Hensel, M. (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* **3**: 549-559.
- Harty, J. T., Tvinnereim, A. R., and White, D. W. (2000) CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* **18**: 275-308.
- Hashim, S., Mukherjee, K., Raje, M., Basu, S. K., and Mukhopadhyay, A. (2000) Live *Salmonella* modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J Biol Chem* **275**: 16281-16288.
- Hayward, R. D., Cain, R. J., McGhie, E. J., Phillips, N., Garner, M. J., and Koronakis, V. (2005) Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol Microbiol* **56**: 590-603.
- Heesemann, J., Gaede, K., and Autenrieth, I. B. (1993) Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis. *APMIS* **101**: 417-429.
- Hensel, M. (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **36**: 1015-1023.
- Hensel, M., Shea, J. E., Waterman, S. R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F. C., and Holden, D. W. (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* **30**: 163-174.
- Hesse, M. D., Karulin, A. Y., Boehm, B. O., Lehmann, P. V., and Tary-Lehmann, M. (2001) A T cell clone's avidity is a function of its activation state. *J Immunol* **167**: 1353-1361.
- Hilleman, M. R. (2000) Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine* **18**: 1436-1447.

- Hogan, R. J., Usherwood, E. J., Zhong, W., Roberts, A. A., Dutton, R. W., Harmsen, A. G., and Woodland, D. L. (2001) Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections. *J Immunol* **166**: 1813-1822.
- Hoiseth, S. K. and Stocker, B. A. (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**: 238-239.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* **260**: 547-549.
- Hueck, C. J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Huster, K. M., Busch, V., Schiemann, M., Linkemann, K., Kerksiek, K. M., Wagner, H., and Busch, D. H. (2004) 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* **101**: 5610-5615.
- Huster, K. M., Koffler, M., Stemberger, C., Schiemann, M., Wagner, H., and Busch, D. H. (2006) Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective *Listeria*-specific effector memory T cells. *Eur J Immunol* **36**: 1453-1464.
- Igwe, E. I., Geginat, G., and Russmann, H. (2002) Concomitant cytosolic delivery of two immunodominant listerial antigens by *Salmonella enterica serovar typhimurium* confers superior protection against murine listeriosis. *Infect Immun* **70**: 7114-7119.
- Itoh, Y. and Germain, R. N. (1997) Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4+ T cells. *J Exp Med* **186**: 757-766.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., and Schoenberger, S. P. (2003) CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* **421**: 852-856.
- Jones, B. D. and Falkow, S. (1994) Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect Immun* **62**: 3745-3752.
- Kaech, S. M. and Ahmed, R. (2001) Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* **2**: 415-422.
- Kaech, S. M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. (2002) Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* **111**: 837-851.
- Kaech, S. M., Tan, J. T., Wherry, E. J., Konieczny, B. T., Surh, C. D., and Ahmed, R. (2003) Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* **4**: 1191-1198.
- Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J. B., and Galan, J. E. (1996) A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **21**: 633-641.

- Kaufmann, S. H. (1993) Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* **11**: 129-163.
- Kotton, C. N. and Hohmann, E. L. (2004) Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. *Infect Immun* **72**: 5535-5547.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J. E., and Aizawa, S. I. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I., and Galan, J. E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10225-10230.
- Kuhle, V. and Hensel, M. (2004) Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2812-2826.
- Kursar, M., Bonhagen, K., Kohler, A., Kamradt, T., Kaufmann, S. H., and Mittrucker, H. W. (2002) Organ-specific CD4⁺ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **168**: 6382-6387.
- Ladel, C. H., Flesch, I. E., Arnoldi, J., and Kaufmann, S. H. (1994) Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both M. *J Immunol* **153**: 3116-3122.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* **1**: 311-316.
- Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2000) Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* **290**: 92-97.
- Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2002) Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol* **2**: 982-987.
- Lauvau, G., Vijh, S., Kong, P., Horng, T., Kerksiek, K., Serbina, N., Tuma, R. A., and Pamer, E. G. (2001) Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine. *Science* **294**: 1735-1739.
- Lee, S. K. and Surh, C. D. (2005) Role of interleukin-7 in bone and T-cell homeostasis. *Immunol Rev* **208**: 169-180.
- Levine, M. M. and Dougan, G. (1998) Optimism over vaccines administered via mucosal surfaces. *Lancet* **351**: 1375-1376.
- Levine, M. M., Ferreccio, C., Abrego, P., Martin, O. S., Ortiz, E., and Cryz, S. (1999) Duration of efficacy of Ty21a, attenuated *Salmonella typhi* live oral vaccine. *Vaccine* **17 Suppl 2**: S22-S27.
- Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M., and O'Garra, A. (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* **154**: 5071-5079.

- Mallone, R., Kochik, S. A., Reijonen, H., Carson, B., Ziegler, S. F., Kwok, W. W., and Nepom, G. T. (2005) Functional avidity directs T-cell fate in autoreactive CD4+ T cells. *Blood* **106**: 2798-2805.
- Marrack, P. and Kappler, J. (2004) Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol* **22**: 765-787.
- Marriott, I., Hammond, T. G., Thomas, E. K., and Bost, K. L. (1999) *Salmonella* efficiently enter and survive within cultured CD11c+ dendritic cells initiating cytokine expression. *Eur J Immunol* **29**: 1107-1115.
- Masopust, D., Vezys, V., Usherwood, E. J., Cauley, L. S., Olson, S., Marzo, A. L., Ward, R. L., Woodland, D. L., and Lefrancois, L. (2004) Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin. *J Immunol* **172**: 4875-4882.
- Mercado, R., Vijh, S., Allen, S. E., Kerksiek, K., Pilip, I. M., and Pamer, E. G. (2000) Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* **165**: 6833-6839.
- Miao, E. A., Brittnacher, M., Haraga, A., Jeng, R. L., Welch, M. D., and Miller, S. I. (2003) *Salmonella* effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* **48**: 401-415.
- Miao, E. A. and Miller, S. I. (2000) A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7539-7544.
- Miao, E. A., Scherer, C. A., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G., Baumler, A. J., and Miller, S. I. (1999) *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* **34**: 850-864.
- Michalek, S. M., Lackner, A. A., Katz, J., Russell, M. W., Eldridge, J. H., Mestecky, J., Lallone, R., and Moldoveanu, Z. (1995) Oral immunization studies with *Streptococcus mutans* and influenza vaccines in rhesus macaque monkeys. *Adv Exp Med Biol* **371B**: 1423-1429.
- Mittrucker, H. W. and Kaufmann, S. H. (2000) Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Leukoc Biol* **67**: 457-463.
- Mittrucker, H. W., Kohler, A., and Kaufmann, S. H. (2002) Characterization of the murine T-lymphocyte response to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. *Infect Immun* **70**: 199-203.
- Murray, R., Suda, T., Wrighton, N., Lee, F., and Zlotnik, A. (1989) IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets. *Int Immunol* **1**: 526-531.
- Namen, A. E., Lupton, S., Hjerrild, K., Wignall, J., Mochizuki, D. Y., Schmierer, A., Mosley, B., March, C. J., Urdal, D., and Gillis, S. (1988) Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* **333**: 571-573.
- Obert, S., O'Connor, R. J., Schmid, S., and Hearing, P. (1994) The adenovirus E4-6/7 protein transactivates the E2 promoter by inducing dimerization of a heteromeric E2F complex. *Mol Cell Biol* **14**: 1333-1346.

- Pantheil, K., Meinel, K. M., Domenech, V. E., Retzbach, H., Igwe, E. I., Hardt, W. D., and Russmann, H. (2005) *Salmonella* pathogenicity island 2-mediated overexpression of chimeric SspH2 proteins for simultaneous induction of antigen-specific CD4 and CD8 T cells. *Infect Immun* **73**: 334-341.
- Paterson, Young and Thole, Eisenstein, Vijn and Pamer (1999). Intracellular Bacterial Vaccine Vectors. 1.Auflage. John Wiley&Sons
- Paul W. (1998). Fundamental immunology.4. Auflage. Raven Press
- Parry, C. M., Hien, T. T., Dougan, G., White, N. J., and Farrar, J. J. (2002) Typhoid fever. *N Engl J Med* **347**: 1770-1782.
- Prlic, M., Hernandez-Hoyos, G., and Bevan, M. J. (2006) Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *J Exp Med* **203**: 2135-2143.
- Pugsley, A. P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50-108.
- Rock, K. L., Gamble, S., and Rothstein, L. (1990) Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* **249**: 918-921.
- Rosqvist, R., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1991) Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* **59**: 4562-4569.
- Russmann, H., Igwe, E. I., Sauer, J., Hardt, W. D., Bubert, A., and Geginat, G. (2001) Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing hybrid *Yersinia* type III proteins. *J Immunol* **167**: 357-365.
- Russmann, H., Shams, H., Poblete, F., Fu, Y., Galan, J. E., and Donis, R. O. (1998) Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science* **281**: 565-568.
- Russmann, H., Weissmuller, A., Geginat, G., Igwe, E. I., Roggenkamp, A., Bubert, A., Goebel, W., Hof, H., and Heesemann, J. (2000) *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* **30**: 1375-1384.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* **22**: 745-763.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**: 708-712.
- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., and Lefrancois, L. (2000) Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* **1**: 426-432.
- Schmidt, H. and Hensel, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**: 14-56.

- Schodel, F. and Curtiss, R., III (1995) *Salmonellae* as oral vaccine carriers. *Dev Biol Stand* **84**: 245-253.
- Seder, R. A. and Ahmed, R. (2003) Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* **4**: 835-842.
- Seder, R. A. and Paul, W. E. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* **12**: 635-673.
- Shata, M. T., Stevceva, L., Agwale, S., Lewis, G. K., and Hone, D. M. (2000) Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Mol Med Today* **6**: 66-71.
- Shea, J. E., Beuzon, C. R., Gleeson, C., Mundy, R., and Holden, D. W. (1999) Influence of the *Salmonella typhimurium* pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse. *Infect Immun* **67**: 213-219.
- Shedlock, D. J. and Shen, H. (2003) Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**: 337-339.
- Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A., and Ley, T. J. (1998) How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* **10**: 581-587.
- Sijts, A. J., Pilip, I., and Pamer, E. G. (1997) The *Listeria monocytogenes*-secreted p60 protein is an N-end rule substrate in the cytosol of infected cells. Implications for major histocompatibility complex class I antigen processing of bacterial proteins. *J Biol Chem* **272**: 19261-19268.
- Slifka, M. K. and Ahmed, R. (1998) Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol* **10**: 252-258.
- Spreng, S., Dietrich, G., and Weidinger, G. (2006) Rational design of *Salmonella*-based vaccination strategies. *Methods* **38**: 133-143.
- Sprent, J. and Surh, C. D. (2001) Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol* **13**: 248-254.
- Stender, S., Friebel, A., Linder, S., Rohde, M., Mirolid, S., and Hardt, W. D. (2000) Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* **36**: 1206-1221.
- Sun, J. C. and Bevan, M. J. (2003) Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**: 339-342.
- Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Townsend, S. M., Ficht, T. A., Adams, L. G., and Baumler, A. J. (1999) Of mice, calves, and men. Comparison of the mouse typhoid model with other *Salmonella* infections. *Adv Exp Med Biol* **473**: 261-274.
- van Ginkel, F. W., Nguyen, H. H., and McGhee, J. R. (2000) Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis* **6**: 123-132.
- Vassiloyanakopoulos, A. P., Okamoto, S., and Fierer, J. (1998) The crucial role of polymorphonuclear leukocytes in resistance to *Salmonella dublin* infections in genetically susceptible and resistant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7676-7681.

- Vijh, S. and Pamer, E. G. (1997) Immunodominant and subdominant CTL responses to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **158**: 3366-3371.
- Wherry, E. J., Teichgraber, V., Becker, T. C., Masopust, D., Kaech, S. M., Antia, R., von Andrian, U. H., and Ahmed, R. (2003) Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* **4**: 225-234.
- Wick, M. J., Harding, C. V., Normark, S. J., and Pfeifer, J. D. (1994) Parameters that influence the efficiency of processing antigenic epitopes expressed in *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **62**: 4542-4548.
- Wolint, P., Betts, M. R., Koup, R. A., and Oxenius, A. (2004) Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8+ T cells. *J Exp Med* **199**: 925-936.
- Wong, P. and Pamer, E. G. (2001) Cutting edge: antigen-independent CD8 T cell proliferation. *J Immunol* **166**: 5864-5868.
- Wong, P. and Pamer, E. G. (2003) Feedback regulation of pathogen-specific T cell priming. *Immunity* **18**: 499-511.
- Wu, Y. and Liu, Y. (1994) Viral induction of co-stimulatory activity on antigen-presenting cells bypasses the need for CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Curr Biol* **4**: 499-505.
- Yip, H. C., Karulin, A. Y., Tary-Lehmann, M., Hesse, M. D., Radeke, H., Heeger, P. S., Trezza, R. P., Heinzl, F. P., Forsthuber, T., and Lehmann, P. V. (1999) Adjuvant-guided type-1 and type-2 immunity: infectious/noninfectious dichotomy defines the class of response. *J Immunol* **162**: 3942-3949.
- Zaph, C., Uzonna, J., Beverley, S. M., and Scott, P. (2004) Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med* **10**: 1104-1110.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J. (1998) Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* **8**: 591-599.
- Zinkernagel, R. M. (2000) On immunological memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 369-371.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann, für die freundliche Aufnahme an das Max von Pettenkofer-Institut und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Rüssmann möchte ich für sein Vertrauen danken, mir eine Doktorandenstelle in seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt zu haben. Für die Bereitstellung des spannenden Themas und die motivierende Betreuung durch nie endende Begeisterungsfähigkeit. Für die immer freundliche Unterstützung und Geduld bei Problemen und Fragen, sowie für die wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Busch, für seine Kooperation, bei der es Zeit für Diskussionen gab und immer wieder neue hilfreiche Ideen. Für die Möglichkeit der Zusammenarbeit mit seinem Labor und natürlich dankeschön für die Tetramer-Lieferungen.

Allen Mitarbeitern unseres Labors. Besonders Victoria Sevil, für ihre freundschaftliche Unterstützung, nicht nur im Laboralltag, und für das gemeinsame Lernen. Und Klaus Panthel, für die Beantwortung zahlreicher Fragen, sowie für seine Unterstützung auf vielen Gebieten, ob Tierstall, Labor, Computer oder Fahrrad, Klaus hatte immer einen Rat parat. Gudrun Pfaffinger für die tolle Neuorganisation unseres Labors.

Allen Mitarbeitern des 3. und 4. Stockes, insbesondere Rike Feldmann und Kirsten Hildinger, für ihr immer offenes Ohr bei Problemen jeglicher Art. Außerdem dem gesamten Tierstallteam und die meistens gute Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Busch, besonders Katharina Huster, für ihre geduldige Beantwortung unzähliger Fragen und Hilfe bei vielen Experimenten.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Brocker, die meine stundenlangen FACS-Termine freundlich geduldet haben.

Meinen liebsten Freunden, Birgit, Ulli, Bettina, Kathrin, Christiane und Jörg, die mir das Abschalten vom Labor immer leicht gemacht haben.

Meinen Eltern, für ihre liebevolle Unterstützung, die mir nicht nur während der letzten vier Jahre immer wieder Kraft gegeben hat.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Katrin Meinel
geboren am 22.03.1976
in Kempten

AUSBILDUNG

- 09/02 - 01/07 Promotion am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und med. Mikrobiologie in München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Rüssmann
- 09/01- 07/02 wissenschaftl. Angestellte in Freiburg in der GenovacAG: Herstellung und Charakterisierung eines CEA-spezifischen Immuntoxins
- 10/2000- 07/01 Diplomarbeit an der medizinischen Fakultät Pharmakologie und Toxikologie an der Universität Ulm in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Gierschik
Thema: Charakterisierung des Einflusses von Rac1 auf die wachstumsfaktorinduzierte Migration von humanen Pankreaskarzinomzellen
- 09/2000 Diplomprüfung: Abschluss als Diplom-Biologin
- 10/98 Vordiplom
- 10/96- 08/01 Studium der Biologie an der Universität Ulm
Studienschwerpunkte:
- Mikrobiologie
 - Molekulare Pflanzenphysiologie
 - Pharmakologie
- 09/86- 05/95 Hildegardis-Gymnasium in Kempten, Abschluss Abitur

AUSLANDSAUFENTHALT

- 07/95- 06/96 Besuch einer Sprachschule in Leeds:
Abschluss des First Certificate in English
Abschluss des Certificate of Proficiency in English

ZUSATZQUALIFIKATIONEN

- 01/03- 11/03 Intellectual Property Management