

**Einfluss der Lokalisierung von Antigenen in *Salmonella*-
Vakzinstämmen auf die CD4⁺-T-Zellantwort**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Konstantin Rizos
aus Aschaffenburg
im Juni 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Weiß
Sondergutachter: Prof. Dr. T.F. Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2004

Teile dieser Arbeit sind oder werden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Kramer,U., Rizos,K.*, Apfel,H., Autenrieth,I.B. und Lattemann,C.T. (2003). Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains. **Infect. Immun.** 71, 1944-1952.

Rollenhagen,C., Sørensen,M., Rizos,K., Hurvitz,R. und Bumann,D. (2004). Antigen selection based on expression levels during infection facilitates vaccine development for an intracellular pathogen. (**PNAS**, in Druck)

Rizos,K., Lattemann,C.T., Bumann,D., Meyer,T.F., and Aebischer,T. (2003). Autodisplay: Efficacious Surface Exposure of Antigenic UreA Fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* Vaccine Strains. **Infect. Immun.** 71, 6320-6328.

Rizos, K., Lattemann, C.T., Bumann, D. (2004). Preferential CD4 T Cell Recognition of *Salmonella* Outer Membrane Antigens Independent of their Surface Exposure. (Manuskript eingereicht)

* gleicher Beitrag

Mein Dank gilt Herrn Dr. Heiko Apfel und Herrn Dr. I.P. Thrippleton für die Möglichkeit diese Arbeit bei der CREATOGEN AG zu beginnen. Besonders möchte ich bei Herrn Prof. Dr. Thomas F. Meyer und Dr. Dirk Bumann bedanken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit am MPI für Infektionsbiologie fortzusetzen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Volker Müller, Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß und Herrn Prof. Dr. Thomas F. Meyer für die Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät für Biologie der LMU München.

Besonders bedanke ich mich bei Dr. Dirk Bumann, Dr. Anton Aebischer, Dr. Claus Lattemann, Dr. Carol Gibbs und Dr. Jochen Maurer für die ständige Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Anregungen und wissenschaftlichen Hilfestellungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank an Prof. Dr. I.B. Autenrieth und Dr. Uwe Kramer für die Kooperation bei dieser Arbeit.

Für das angenehme Umfeld im Labor der CREATOGEN AG und des MPI für Infektionsbiologie bei Meike Sörensen, Claudia Rollenhagen, Kerstin Hoffmann und Kirstin Burmeister (auch für die Hilfe bei den Hp-Versuchen), Matthias Selbach, Stefan Moese, Dr. Jura Churin, Dr. Christian Wunder, Christoph Lippuner, Oliver Kepp, Matthias Weber, Dr. Anna Walduck, Andrea Schmitt, Nico Sabarth, Dr. Simone Spreng, Marie Kirchner, Elke Ziska, Dr. Agnes Sczepek, Nicole Paland, Dagmar Heuer, Wolfram Metzger, Susanne Diescher, Heide Niesalla, Elke Gerland, Dr. Elke Freissler, Peter Kern, Dr. Thilo Fuchs, Christoph Bäuscher, Dr. C.J. Hueck, Dr. Thilo Pfeuffer, Susanne Ehnle, Gerda Müller, Sigrid Höß, Carmen Sailer, Julia Brenmoehl, Gertrud Pöschl und Safet Biberovic.

Birgit für unzähliges Kleines und Großes.

An meine Eltern: Danke für alles.

1 Einleitung	1
1.1 <i>Salmonella</i> enterica Serovare	1
1.2 Infektionszyklus von Typhimurium in Mäusen	2
1.3 Immunantwort des Wirts gegen <i>Salmonella</i>	4
1.4 Transgene T-Zell-Rezeptor Mausmodelle zur Untersuchung der zellulären Immunantwort gegen <i>Salmonella in vivo</i>	5
1.5 <i>Salmonella</i> -Lebendimpfstoffe	8
1.6 Ziele dieser Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Mäuse	15
2.1.2 Bakterienstämme	15
2.1.3 Zelllinien	16
2.1.4 Nährmedien	16
2.1.5 Plasmide	17
2.1.6 Oligonukleotide	19
2.1.7 Antikörper und Antiseren	21
2.1.8 Häufig verwendetet Puffer und Lösungen	22
2.1.9 Chemikalien, Enzyme und Standards	22
2.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.11 Software	23
2.2 Methoden	23
2.2.1 Anzucht von Bakterien	23
2.2.2 Nukleinsäure-Arbeitstechniken	24
2.2.2.1 Standardmethoden	24
2.2.2.3 Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen	24
2.2.2.3 Ethanol-fällung	24
2.2.2.4 Schnellpräparation von bakterieller chromosomaler DNA	24
2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.2.2.6 Oligonukleotid-Hybridisierungen	25
2.2.2.7 Deletionen chromosomaler Regionen mittels λ -Red System	25
2.2.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	26
2.2.3.1 Membranpräparationen (nach Nikaido <i>et al.</i> , 1994)	26
2.2.3.2 Periplasmapräparation (nach Ames <i>et al.</i> , 1984, modifiziert)	26
2.2.3.3 Proteasebehandlung von Bakterien	26
2.2.3.4 Trichloracetat-Fällung von Proteinen aus Lösungen	26
2.2.3.4 SDS-PAGE	27
2.2.3.5 Coomassie Färbung	27
2.2.3.6 Silberfärbung, modifiziert (Blum <i>et al.</i> , 1987)	27
2.2.3.7 Western Blot Analyse	27
2.2.3.8 Immunfluoreszenzfärbung von Bakterien	28
2.2.3.8.1 Bakterien in Suspension	28
2.2.3.8.2 Intrazelluläre Bakterien	28
2.2.3.8.3 Konfokale Mikroskopie	28
2.2.3.9 SDS-Sensitivität von Bakterien	29
2.2.3.10 Durchflußzytometrie von <i>in vitro</i> kultivierten <i>Salmonella</i> -Stämmen	29
2.2.3.11 Infektion von J-774A.1 Zellen mit <i>Salmonella</i>	29
2.2.4 Tierexperimentelle Arbeiten	30

2.2.4.1 Transgenes T-Zell-Modell (Bumann, 2001a)	30
2.2.4.1.1 Transfer von transgenen Splenocyten aus F1 DO11.10xBALB/c in BALB/c Mäuse	30
2.2.4.1.2 Immunisierung von Mäusen mit <i>Salmonella</i> -Stämmen	30
2.2.4.1.3 Analyse der Aktivierung transgener T-Zellen in Peyer´schen Plaques und CFU-Bestimmung	31
2.2.4.2 Kolonisierung der Peyer´schen Plaques durch <i>Salmonella</i> und bakterielle GFP-OVA Synthese	32
2.2.4.3 <i>H. pylori</i> Protektionsversuche	32
2.2.4.3.1 Immunisierungsexperimente	32
2.2.4.3.2 Belastungsinfektion mit <i>H. pylori</i>	32
2.2.4.3.3 Bestimmung der Besiedlung von Mäusen mit <i>H. pylori</i>	32
2.2.4.4 GFP-OVA Abbau in rekombinanten <i>Salmonella</i> -Stämmen	33
3. Experimente und Ergebnisse	34
3.1 Darstellung eines Ovalbumin-Epitops in verschiedenen zellulären Kompartimenten von <i>Salmonella</i> und Optimierung der Kolonisierung rekombinanter Impfstämme	34
3.1.1 Präsentation des OVA-Epitops auf der Zelloberfläche attenuierter <i>Salmonella</i> -Stämme durch den AIDA-I Autotransporter	34
3.1.1.1 Konstruktion einer <i>ova-ha-ctB-aida-i</i> Fusion	35
3.1.1.2 Das OVA-HA-CTB-AIDA-I Fusionsprotein wird auf der Zelloberfläche von attenuierten <i>Salmonella</i> -Stämmen präsentiert	39
3.1.1.3 Regulierte Synthese des OVA-HA-CTB-AIDA-I Fusionsproteins beeinflusst die Kolonisierungsfähigkeit attenuierter <i>Salmonella</i> - Impfstämme	41
3.1.1.4 Modulation der Proteinsynthese durch verschiedene Shine- Dalgarno-Sequenzen und Einfluss auf die Kolonisierung	43
3.1.2 Darstellung des OVA-Epitops auf der Innenseite der äußeren Membran attenuierter <i>Salmonella</i> -Stämme als Fusionsprotein mit dem Braun´schen Lipoprotein	46
3.1.2.2 Lokalisation von Lpp-OVA Fusionsproteinen in der äußeren Membran von attenuierten <i>Salmonella</i> -Stämmen und Einfluss auf das Wachstum	47
3.1.2.3 Konstruktion einer CREA0293 Δ <i>lpp</i> Mutante und SDS-Sensitivität rekombinanter <i>Salmonella</i> -Stämme	50
3.1.2.4 Modulation der Produktion von Lpp-OVA führt zu veränderten Kolonisierungseigenschaften rekombinanter <i>Salmonella</i> -Stämme	51
3.1.3 Darstellung des OVA-Epitops im Periplasma attenuierter <i>Salmonella</i> - Stämme mittels dem Galactose-Bindeprotein MglB	53
3.1.3.1 Konstruktion einer <i>ova-ha-mglB</i> Fusion	53
3.1.3.2 Einfluss der OVA-HA-MglB Synthese im <i>Salmonella</i> -Stamm CREA0293 auf das Wachstum und periplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins	55
3.1.3.3 Die Modulation der OVA-HA-MglB Proteinmenge durch verschiedene RBS-Varianten beeinflusst die Kolonisierung attenuierter <i>Salmonella</i> -Stämme	56
3.2 T-Zell Aktivierung im OVA-Modell in Abhängigkeit von der Antigenlokalisierung in rekombinanten <i>Salmonella</i> -Vakzinstämmen	57
3.2.1 CTB-AIDA-I hat keinen immunstimulatorischen Einfluss <i>in vivo</i>	58

3.2.1.1 Konstruktion	58
3.2.1.2 <i>In vivo</i> Versuche	59
3.2.2 Kinetik der T-Zellaktivierung und Kolonisierung durch OVA-HA-CTB-AIDA-I produzierende <i>Salmonella</i> -Impfstämme	60
3.2.3 Einfluss der Lokalisation und Menge von Antigenen in <i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>Typhimurium</i> auf die CD4 ⁺ -T-Zellantwort	61
3.3 Präsentation von antigenen Determinanten auf der Zelloberfläche von attenuierten <i>Salmonella</i> -Stämmen durch den AIDA-I Autotransporter	66
3.3.1 Autodisplay des Hsp60 ₇₄₋₈₆ Epitops aus <i>Yersinia enterocolitica</i>	66
3.3.1.1 Subklonierung einer <i>hsp60</i> ₇₄₋₈₆ - <i>ha-ctxB-aida-i</i> Genfusion in ein <i>thyA</i> -stabilisiertes Plasmid	66
3.3.1.2 Synthese und Oberflächenexposition von Hsp60 ₇₄₋₈₆ -HA-CTB-AIDA in dem attenuierten <i>Salmonella</i> Stamm CREA1323	68
3.3.1.3 CREA1323(pKRI43) induziert eine T-Zellantwort <i>in vivo</i>	70
3.3.2 Präsentation von cysteinhaltigen Passagierdomänen in <i>Salmonella</i> -Impfstämmen	70
3.3.2.1 Konstruktion von translationalen Fusionen aus dem βGP1 Epitop und CTB-AIDA-I	70
3.3.2.2 Disulfidbrückenbindungen in der Passagierdomäne verhindern eine effiziente Oberflächenpräsentation	72
3.3.3 Autodisplay von UreA-Fragmenten aus <i>H. pylori</i> in einem <i>Salmonella</i> -Impfstamm	74
3.3.3.1 Konstruktion der <i>ureA</i> ₂₇₋₂₃₈ - <i>ha-aida-i</i> Fusion	74
3.3.3.2 UreA-Fragmente werden auf der Zelloberfläche von <i>Salmonella</i> -Impfstämmen präsentiert	77
3.3.3.3 Die Oberflächenpräsentation UreA ₂₇₋₂₃₈ in einem <i>Salmonella</i> -Vakzinstamm schützt Mäuse nach oraler Immunisierung gegen eine <i>H. pylori</i> -Belastungsinfektion	78
3.3.3.4 Immunisierung mit einem <i>Salmonella</i> -Stamm, der ein UreA ₂₇₋₅₃ -Peptid auf der Zelloberfläche präsentiert, führt zu einer Reduktion der <i>H. pylori</i> Last	80
3.4 Antigen Abbau <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	83
4. Diskussion	87
4.1 Aufklärung des Einflusses der Antigenlokalisierung in <i>Salmonella</i> -Vakzinstämmen auf die frühe CD4 ⁺ -T-Zellantwort durch Verwenden des OVA-Systems	89
4.1.1 Strategie	89
4.1.2 Auswahl der Fusionspartner und Optimierung rekombinanter <i>Salmonella</i> -Impfstämme	90
4.1.2.1 Präsentation des OVA-Epitops auf der Zelloberfläche durch die AIDA-I-Autotransporterdomäne	91
4.1.2.2 Verankerung des OVA-Epitops auf der Periplasma-zugewandten Seite der äußeren Membran in <i>Salmonella</i> durch das Braun'sche Lipoprotein	93
4.1.2.3 Darstellung des OVA-Epitops im Periplasma durch das Galactose-Bindeprotein MglB	94
4.1.2.4 Cytoplasmatische Darstellung des OVA-Epitops durch GFP	95
4.1.3 Antigen in der äußeren Membran induzieren unabhängig ihrer Orientierung eine potente CD4 ⁺ -T-Zellantwort	95

4.2 Autodisplay eines des Hsp60 ₇₄₋₈₆ -Epitops aus <i>Yersinia enterocolitica</i> in einem <i>Salmonella</i> -Vakzinstamms induziert antigenspezifische Effektor-CD4 ⁺ -T-Zellen <i>in vivo</i>	99
4.3 Einschränkung des AIDA-I Expressionssystems: Translokation von cysteinhaltigen Passagierdomänen in <i>Salmonella</i> -Impfstämmen	100
4.4 Zum Autodisplay von UreA-Fragmenten aus <i>H. pylori</i> in einem <i>Salmonella</i> -Impfstamm	101
4.5 Alternative Präsentationssysteme für Antigene in <i>Salmonella</i> -Vakzinstämmen	102
4.6 Ausblick	104
5. Zusammenfassung	105
6. Abkürzungen	107
7. Literatur	108

1. Einleitung

In der Gattung *Salmonella* sind wichtige Pathogene zu finden, aber sichere, attenuierte Stämme sind attraktive Kandidaten für den Einsatz als orale Lebendimpfstoffe. Bisher zeigen präklinische Versuche vielversprechende Ergebnisse und sprechen für eine forcierte Weiterentwicklung dieses Ansatzes. Die Optimierungsbemühungen waren bisher primär rein empirischer Natur. Statt dessen ist es aber nötig, eine rationale Methodik anzuwenden, um eine Verbesserung von Impfstämmen zu erzielen.

In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Steigerung der zellulären CD4⁺-T-Zellantwort gegen rekombinante *Salmonella*-Vakzinestämme, unter Einbezug der neuesten Erkenntnisse der Immunreaktion gegen *Salmonella*, gerichtet.

Im folgenden wird zunächst ein Überblick über die *Salmonella*-Infektionsbiologie und die Immunreaktionen gegeben. Danach werden die bisherigen Erfahrungen mit *Salmonella*-basierten Lebendimpfstoffen und Möglichkeiten zur Verbesserung ihrer Wirksamkeit diskutiert. Auf dieser Grundlage werden dann die zu prüfende Arbeitshypothese und die einzelnen Ziele für ihre Validierung vorgestellt.

1.1 *Salmonella enterica* Serovare

Die Gram-negativen, stäbchenförmigen und fakultativ intrazellulären *Salmonella* gehören zur Familie der *Enterbacteriaceae* und werden in die Spezies *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica*, die sieben Subspezies beinhaltet, zusammengefaßt. Humanpathogene *Salmonella* sind ausnahmslos in der Subgruppe 1 (Subspezies *enterica*) zuzuordnen und lassen sich aufgrund spezifischer Merkmale, wie den O-spezifischen Polysaccharidketten (O-Antigene) oder der hochvariablen zentralen Domäne der Flagellenfilamente (H-Antigene) in mehr als 2000 Serovare unterteilen. Infektionen mit *Salmonella enterica*-Serovaren erfolgen primär über den fäkal-oralen Weg. Je nach Serovar und Wirt werden sowohl lokale, selbstlimitierende Darminfektionen als auch schwere, systemische Krankheitsverläufe beobachtet. Dabei sind als die klinisch bedeutsamsten Serovare von *Salmonella enterica* Typhimurium, Enteritidis, Typhi und Paratyphi zu nennen.

Typhi zeigt eine hohe Wirtsspezifität für den Menschen und infiziert mit Ausnahme der Schimpansen weder Haus- noch Wildtiere. Beim Menschen verursacht Typhi eine systemische Infektion (Typhus abdominalis), die sich in schweren Krankheitssymptomen, wie Multiorganversagen oder septischen Schock, äußert. In Entwicklungsländern beträgt die Inzidenz etwa 16 Millionen pro Jahr mit geschätzten 600.000 Todesfällen.

In Nord- und Mitteleuropa wird Typhi hauptsächlich durch Reisende importiert und tritt nur sporadisch auf.

Infektionen mit den Serovaren *Typhimurium* und Enteritidis, die ein breites Wirtsspektrum aufweisen und verschiedene Krankheiten auslösen, führen im Gegensatz zu Typhi beim Menschen zu einer selbstlimitierenden Gastroenteritis. Bei immunsupprimierten Menschen können enteritische Salmonellen analog zu Typhi systemisch disseminieren und einen letalen Verlauf nehmen, falls sie nicht behandelt werden. Enteritische Salmonellen treten in den Industrienationen sowohl endemisch als auch epidemisch auf und nehmen an Häufigkeit zu aufgrund nicht kontrollierter Infektionen bei Nutztieren (insbesondere Hühner und Rind).

Das Serovar *Typhimurium*, das auch in hohen Dosen beim Menschen in der Regel nur eine Gastroenteritis hervorruft, verursacht in empfindlichen (genetisch suszeptiblen) Mäusen bereits mit einer geringen Infektionsdosis eine systemische, letale Infektion, die vom Krankheitsverlauf dem typhoiden Fieber beim Menschen ähnelt. Aus diesem Grund werden Infektionsstudien von *Typhimurium*-Stämmen in Mäusen als präklinisches Modell zur Charakterisierung der Pathogenität und Immunität sowie zur Durchführung von Impfstoffstudien eingesetzt.

1.2 Infektionszyklus von *Typhimurium* in Mäusen

Mittlerweile stellt dieses System eines der best charakterisierten Tiermodelle für Bakterium-Wirt-Interaktionen dar (Cotter und DiRita, 2000). Nach oraler Infektion überlebt ein kleiner Anteil der Bakterien das saure Milieu des Magens und gelangt in den unteren Dünndarmabschnitt (terminales Ileum) zu den Peyer'schen Plaques, die die primäre Eintrittspforte für *Salmonella* darstellen (vgl. Abb. 1). Im Bereich der Peyer'schen Plaques weist die Dünndarmschleimhaut keine Zotten auf sondern grenzt an das follikelassoziierte Epithel (FAE). Das FAE besteht hauptsächlich aus Enterocyten und den M-Zellen und grenzt die darunter lokalisierten Lymphfollikel vom Darmlumen ab. M-Zellen repräsentieren einen spezialisierten Zelltyp, der nur im Zusammenhang mit dem FAE vorkommt und im Gegensatz zum normalen Intestinalgewebe keine Mikrovilli aufweist und zur Transzytose befähigt ist. Die *Salmonella*-Pathogenese beginnt mit der Invasion und Zerstörung der M-Zellen. Danach gelangen die Bakterien zum subepithelialen Gewebe. Dort treffen sie auch Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APCs: Makrophagen oder dendritische Zellen). Die Transmigration kann auch durch die Invasion von Epithelzellen erfolgen (Galan, 1996; Vazquez-Torres *et al.*, 1999) oder durch dendritische Zellen auf der Mukosa-Oberfläche (Rescigno *et al.*, 2001).

Serovare, die keine ausgeprägte Wirtsspezifität zeigen, scheinen eher eine auf das Epithel beschränkte Infektion zu verursachen, während Wirts-adaptierte *Salmonella* im lymphoidalen Gewebe anzutreffen sind (Jones *et al.*, 1994).

Salmonella kann intrazellulär in Makrophagen und dendritischen Zellen eingeschlossen in Phagosomen überleben und replizieren. Über diese Zellen erfolgt die für das Erreichen einer systemischen Infektion erforderliche Dissemination der Bakterien (Vazquez-Torres *et al.*, 1999), die zur Kolonisierung von mesenterialen Lymphknoten, Leber und Milz führt.

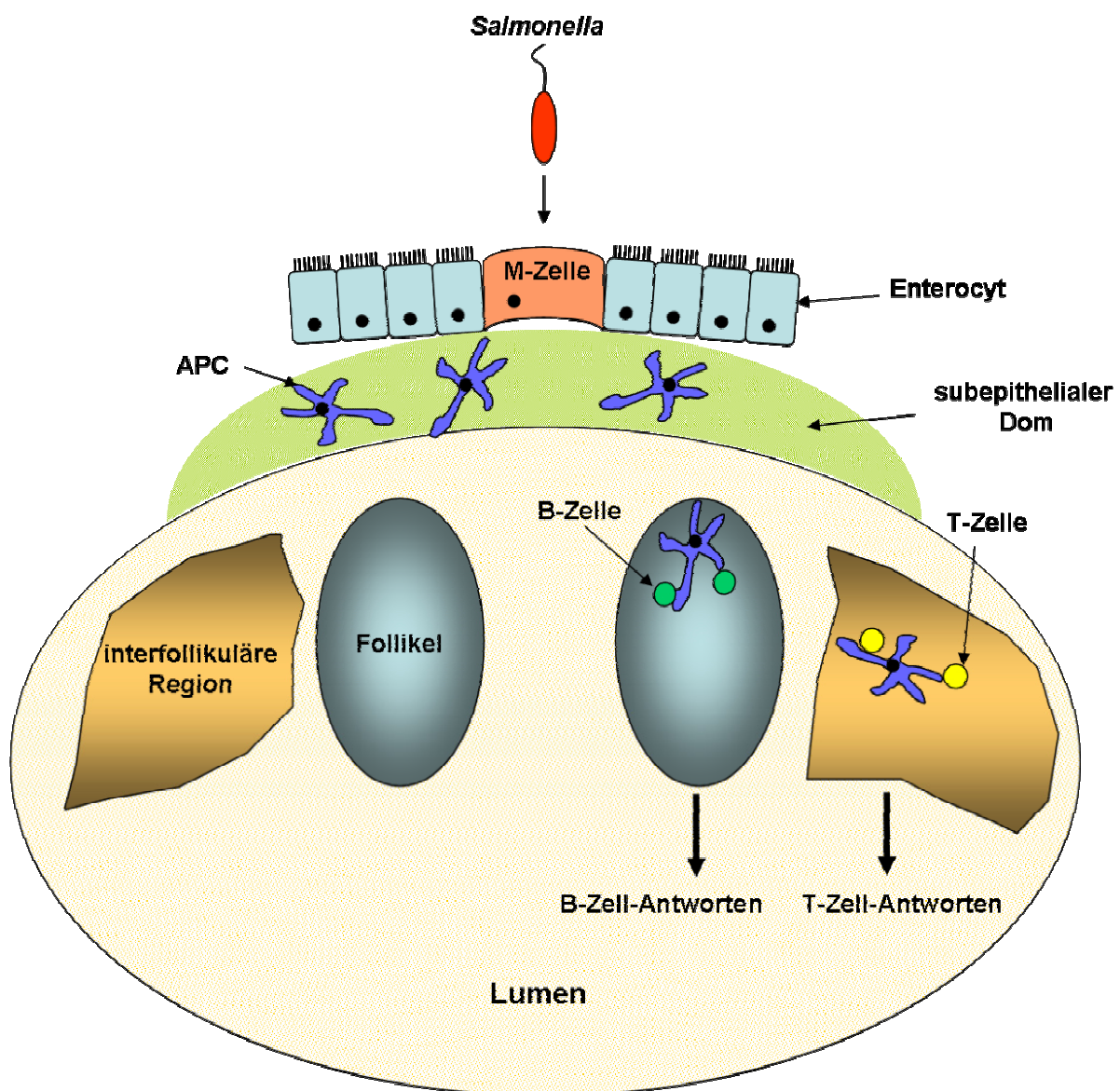


Abb. 1: Schematische Darstellung der Peyer'schen Plaques. APC: Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cell*), wie dendritische Zellen oder Makrophagen. (modifiziert nach (Neurath *et al.*, 2002))

Dies bedingt anschließend die Bildung von Mikroabzessen, die sich im späteren Verlauf zu Granulomen mit aktivierten, mononukleären Zellen entwickeln (Mastroeni und Menager,

2003). Nicht-virulente *Salmonella*-Impfstämme zeichnen sich dadurch aus, dass sie den Organismus nicht systemisch infizieren und hauptsächlich auf die Peyer'schen Plaques begrenzt sind.

1.3 Immunantwort des Wirtsorganismus gegen *Salmonella*

Das angeborene Immunsystem spielt eine essentielle Rolle bei den frühen Antworten des Wirts auf eine Infektion mit *Salmonella* und ist bei den subklinischen Verläufen für die Eindämmung der Krankheit mitverantwortlich (Lalmanach und Lantier, 1999); (Mäkelä und Hormaeche, 1997). Die Bedeutung der Makrophagen und polymorphonukleären Neutrophilen während der frühen Immunantwort (O'Brien *et al.*, 1979) (Vassiloyanakopoulos *et al.*, 1998) liegt insbesondere in der Bildung und Sezernierung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 oder IL-12) nach Stimulation durch Liganden der Toll-Rezeptoren (wie z.B. LPS, Flagellin oder bakterielle Lipoproteine) (Sieling und Modlin, 2002). Im Maus-Modell für typhoides Fieber wird das Wachstum von *Salmonella* im Gewebe während der ersten Tage der Infektion daneben auch durch das NRAMP1 Protein kontrolliert. NRAMP-Homologe wurden in verschiedenen Tieren identifiziert. NRAMP ist ein Phosphoglycoprotein (90-100 kDA), das divalente Metallionen, wie Fe²⁺, Zn²⁺ oder Mn²⁺, pumpt und wird rasch zu SCV's (*Salmonella containing vacuole*) rekrutiert (Vidal *et al.*, 1993). Bisher konnte beim Menschen keine analoge Korrelation zwischen einer erhöhten Anfälligkeit für typhoides Fieber und polymorphen Allelen innerhalb oder nahe des NRAMP-Locus festgestellt werden (Dunstan *et al.*, 2001). Dies schließt aber einen möglichen Zusammenhang von NRAMP1 und anderen klinischen Parametern, wie die Schwere des Krankheitsverlaufs oder Inkubationszeit, bisher nicht aus.

Die Kontrolle des *Salmonella*-Wachstums während der frühen Phase einer primären Infektion hängt außerdem von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI) ab, die durch die NADPH-Oxidase (*phox*) in Phagocyten generiert werden. Dies wird durch die extreme Anfälligkeit von gp91*phox*^{-/-} Mäusen für eine Salmonellose verdeutlicht (Mastroeni *et al.*, 2000). *Salmonella* kann der toxischen Wirkung von ROI entgehen, indem die Rekrutierung der NADPH-Oxidase zum Phagosom durch Effektorproteine des Typ II Sekretionssystems der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 2 (SPI-2) inhibiert wird (Vazquez-Torres *et al.*, 2000). SPI-2 ermöglicht es ebenfalls, reaktive Stickstoffintermediate von der SCV fernzuhalten (Chakravorty *et al.*, 2002).

Während das angeborene Immunsystem eine wichtige erste Verteidigungslinie des Wirts gegen eine *Salmonella*-Infektion darstellt, ist eine adaptive Immunantwort nötig für das langfristige Überleben und die Eliminierung von *Salmonella*. Adaptive Immunantworten in

Folge einer Primärinfektion führen daneben auch zu einem vollständigen Schutz gegen Sekundärinfektion mit 10.000facher LD₅₀. T Zellen spielen bei der adaptiven Immunität gegen *Salmonella* eine zentrale Rolle (Mäkelä und Hormaeche, 1997)(Mittrucker und Kaufmann, 2000b). Nacktmäuse und T-Zell-Rezeptor-defiziente Mäuse sind hochgradig anfällig für *Salmonella*-Infektionen. Dabei sind CD4⁺-T-Zellen wichtiger als CD8⁺-T-Zellen (Mastroeni *et al.*, 1992; Nauciel, 1990) (Hess *et al.*, 1996b), die jedoch ebenfalls einen nachweisbaren Beitrag leisten (Lo *et al.*, 1999; Mastroeni *et al.*, 1992; Nauciel, 1990). CD4⁺-T-Helferzellen (T_H) werden in Abhängigkeit von den sekretierten Cytokinen in zwei Typen eingeteilt. T_H1-Zellen produzieren IFN- γ , TNF- α , IL12 und IL-18 und aktivieren dadurch die zelluläre Immunantwort und Entzündungsprozesse, während T_H2-Zellen IL-4, IL-5 und IL-13 sekretieren und damit B-Zellen aktivieren (Neurath *et al.*, 2002). Eine Vielzahl von Studien belegt, dass eine *Salmonella*-Infektion in einer T_H1-Antwort resultiert (Pie *et al.*, 1997; Thatte *et al.*, 1993). Außerdem konnte demonstriert werden, dass eine exogene Zugabe von IFN- γ einen bakteriostatischen Effekt zeigt und dass die Neutralisation von endogen produzierten IFN- γ durch spezifische Antikörper die Mortalität von Mäusen erhöht, die mit *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* infiziert waren (Matsumura *et al.*, 1990; Ramarathinam *et al.*, 1991). Außerdem wurde beobachtet, dass IFN- γ -Rezeptor-defiziente Mäuse hoch anfällig für *Salmonella*-Infektionen sind (Hess *et al.*, 1996). Dies untermauert die zentrale Rolle der T_H1-Zellen bei der Abwehr von *Salmonella*.

Neben T-Zellen sind auch Antikörper für eine vollständige Immunität nötig (Mittrucker *et al.*, 2000a). Außerdem wurde kürzlich demonstriert, dass die T_H1-Antwort in B-Zell-defizienten Mäusen nach einer *Salmonella*-Infektion wesentlich geringer ist als in der Parental-Mauslinie (Ugrinovic *et al.*, 2003), was eventuell durch eine Funktion der B-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen während der frühen Immunantwort interpretiert werden könnte. Ein Hauptproblem bei der Interpretation von Daten, die in B-Zell-defizienten Mäusen generiert wurden, ist die rudimentäre Ausbildung von Peyer'schen Plaques in diesen Mauslinien. In den Peyer'schen Plaques wird die frühe T-Zellantwort induziert (Bumann, 2001a; McSorley *et al.*, 2002) und die mangelnde Ausbildung dieser sekundären lymphatischen Organe könnte den Ablauf der Immunantwort nach oraler Infektion mit *Salmonella* im Vergleich zu normalen Mäusen stark beeinflussen.

1.4 Transgene T-Zell-Rezeptor Mausmodelle zur Untersuchung der zellulären Immunantwort gegen *Salmonella in vivo*

Wie oben erwähnt spielen CD4⁺-T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der adaptiven Immunantwort gegen *Salmonella*. Die wichtigen frühen initialen Schritte der T-Zellaktivierung

lassen sich aber aufgrund der niedrigen Konzentration an Antigen-spezifischen Vorläufer-T-Zellen nur sehr schwer analysieren. Abhilfe lässt sich durch Verwendung von transgenen T-Zell-Rezeptor (tgTCR)-Tiermodelle erzielen, in denen die meisten T Zellen nur ein bekanntes T Zell-Epitop erkennen. Andererseits stellt die hohe Frequenz an mono-spezifischen T-Zellen in tgTCR-Mäusen (zwischen 50% bis 90%) eine unphysiologische Situation dar. Deshalb verwendet man adoptive Transfermodelle, bei denen ca. $1 - 10 \times 10^6$ tgTCR-T-Zellen adoptiv in syngene, nicht-transgene Mäuse transferiert werden, um geringe Konzentrationen (0,2% bis 1%) von spezifischen, naiven CD4⁺-T-Zellen in den chimären Rezipienten zu erzielen. Diese Populationen können dann *in vivo* nachgewiesen werden, wobei dazu ein großes Methoden-Repertoire, wie klonotypische monoklonale Antikörper (Pape *et al.*, 1997), MHCII-Tetramere (Gutgemann *et al.*, 1998) oder CFSE-Färbung (vor dem adoptiven Transfer), zur Verfügung steht. Mit diesen Mitteln können Fragen wie etwa die Stärke oder die anatomische Lokalisation der Immunantwort geklärt werden. Bisher existieren vier unterschiedliche MHCII-restringierte tgTCR-Mausmodelle für *Salmonella* (Bumann, 2003), auf die im folgenden eingegangen werden soll.

Das MHCII-Epitop des Motten-Cytochrom C (Aminosäuren 88 bis 103) wurde in die hypervariable Region des Flagellin codierenden *fliC* Gens inseriert (Verma *et al.*, 1995). tgTCR-Mäuse wurden mit attenuierten *Salmonella enterica* Serovar Dublin, die dieses rekombinante Flagellin unter Kontrolle des P_{*fliC*} Promotors ausprägten, intraperitoneal infiziert (Richter-Dahlfors *et al.*, 1997). Dieses Modell hat einige Nachteile: zum einen wurden transgene Mäuse verwendet, die eine extrem hohe Konzentration (ca. 90%) an mono-spezifischen T-Zellen (Richter-Dahlfors *et al.*, 1997) aufweisen, was eventuell eine unphysiologische T-Zell-Induktion bewirkte (Smith *et al.*, 2000). Außerdem entsprach die Infektionsroute nicht dem natürlichen oralen Infektionsweg von *Salmonella*. Ein weiterer Nachteil des Ansatzes ist die Verwendung des FliC-Proteins als Träger, da es sich abzeichnet, dass während der systemischen Infektion die Flagellen-Expression reprimiert wird (Eriksson *et al.*, 2003; Hughes und Galan, 2002). Die beobachtete T-Zell-Induktion würde deshalb hauptsächlich von der initialen Antigenexposition im Infektions-Inokulum verursacht werden.

Ein neueres tgTCR-Modell wurde zur Untersuchung der Immunantwort gegen ein autologes Antigen entwickelt (McSorley *et al.*, 2002). Dabei wird ein MHCII-beschränktes FliC-Epitop (Aminosäuren 427 bis 441) von einer tgTCR-T-Zell-Linie erkannt. Etwa 2×10^6 tgTCR-T-Zellen wurden in syngene Mäuse vor einer oralen Infektion mit Wildtyp-*Salmonella* adoptiv transferiert. Wie in einer Studie, die mit GFP-OVA gemacht wurde (Bumann, 2001a), konnte in dieser Arbeit die T-Zellreiche interfollikuläre Region der Peyer'schen Plaques als Hauptinduktionsort der T-Zellen identifiziert werden. Aber der größte Nachteil besteht, ähnlich wie im Fall des oben erwähnten Cytochrom C Modells, in der Wahl von FliC als

autologem Antigen (Bumann, 2003; Hughes und Galan, 2002). Einige Unstimmigkeiten dieses Modells lassen sich auf die Verwendung von FliC zurückführen. In den Milzen infizierter Tiere ließen sich keine Antigen-spezifischen T-Zellen nachweisen, obwohl dieses Organ stark infiziert war. Außerdem hatte die T-Zell-Aktivierung schon 12 h und die Antigen-spezifische T-Zell-Anhäufung drei Tage nach der Infektion ihre Maximaerreicht, obwohl die Infektion danach zu einer immer höheren Bakterienlast führt. Dies lässt sich wohl mit der hohen Antigenlast im Infektions-Inokkulum und der darauf folgenden Reprimierung der Flagellensynthese während der Infektion erklären (Bumann, 2003; Eriksson *et al.*, 2003; Hughes und Galan, 2002).

Ein anderer Ansatz bedient sich des oft verwendeten tgTCR DO11.10, der ein MHCII-Epitop des Ovalbumins (Aminosäuren 323 bis 337) erkennt (Pape *et al.*, 1997). Dabei gibt es zwei verschiedene Arten der Expression dieses Epitops: einmal im Kontext des Gesamt-Ovalbumins (Chen und Jenkins, 1999) oder als Fusion mit GFP (Bumann, 2001a; Bumann, 2001b). Die Synthese des Gesamt-Ovalbumins in *Salmonella* ist problematisch, da dieses Protein toxisch wirkt (Wick und Pfeifer, 1996) und die betreffenden Expressions-Plasmide rasch während der Infektion verloren gehen (Chen und Jenkins, 1999), wenn sie nicht balanciert-letal komplementiert werden (Chen und Jenkins, 1999). Außerdem wurden die Daten zur T-Zell-Aktivierung nach einer unnatürlichen subkutanen Infektion von Mäusen, denen vorher 2×10^6 tgTCR-T-Zellen adoptiv transferiert wurden, erhoben.

Wurde jedoch ein Peptid von Ovalbumin (Aminosäuren 319 bis 343) als Fusionsprotein mit GFP in *Salmonella* synthetisiert, wurden bis zu 2×10^5 Kopien pro Zelle gut toleriert und hatten keinen Einfluss auf die Virulenz von attenuierten oder Wildtyp-*Salmonella*-Stämmen (Wendland und Bumann, 2002). Ein weiterer Vorteil ist die Quantifizierbarkeit der Antigenmenge *in situ* mit Durchflußzytometrie (Bumann, 2002) und die Detektierbarkeit in infiziertem Gewebe durch konfokale Mikroskopie (Bumann, 2001a). 4×10^6 tgTCR-T-Zellen wurden den Mäusen vor der oralen Immunisierung mit GFP-OVA ausprägenden *Salmonella*-Stämmen adoptiv transferiert. Es konnte eine Antigen-spezifische T-Zellinduktion beobachtet werden, die sich in einer verstärkten Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und einer Blastenbildung mit anschließender Teilung der spezifischen tgTCR-CD4⁺-T-Zellen äußerte (Bumann, 2001a). Die Induktion erfolgte kontinuierlich und korrelierte dabei mit der *in situ* Menge des fluoreszierenden Antigens. Außerdem wurden der Großteil der Ovalbumin-spezifischen T-Zellen während der gesamten Induktionsphase primär in den interfollikulären Regionen der Peyer'schen Plaques detektiert, während lebende *Salmonella*-Zellen einige 100 µm davon entfernt im subepithelialen Dombereich der Peyer'schen Plaques lokalisiert waren (Bumann, 2001a). Eine Titration der Konzentration der transgenen Zellen in den Peyer'schen Plaques (0,1% bis 0,6%) führte zu keiner Änderung der prozentualen Aktivierung der Ovalbumin-spezifischen transgenen T-Zellen nach einer Infektion mit

rekombinanten *Salmonella*-Stämmen und deshalb scheinen Effekte wie eine intraklonale T-Zell-Kompetition keine Rolle zu spielen (Bumann, 2003). Mit den geschilderten tgTCR-Modellen wurden aber bereits wichtige Informationen zur Kinetik und der Lokalisierung der spezifischen CD4⁺-T-Zell-Antwort erhalten, die mit herkömmlichen Tiermodellen nicht erzielt werden können. Die artifiziell erhöhte Konzentration an spezifischen tgTCR-T-Zellen scheint zumindest im Fall des OVA-Epitop-Systems kein Problem zu sein.

Das beschriebene OVA-System erlaubt Quantifizierung der kritischen frühen Schritte nach der Immunisierung mit rekombinanten *Salmonella*-Vakzinstämmen viel schneller und genauer als in den konventionellen Tiermodellen. Durch frühe Messung der frühen T-Zellaktivierung kann man eine direkte Korrelation zur *Salmonella*-Last im lymphoiden Gewebe und über GFP_OVA auch eine direkte Korrelation zur Antigen-Menge analysieren. Mit den bisherigen konventionellen Methoden ist dies nicht möglich.

1.5 *Salmonella*-Lebendimpfstoffe

Impfstoffe sind ein wirksames und kostengünstiges Mittel gegen Infektionskrankheiten. Unter den vielen Darreichungsformen stellen rekombinante attenuierte *Salmonella*-Stämme, die ein heterologes Antigen synthetisieren, eine vielversprechende Alternative dar, da sie die immunkompetenten Organe (primär die Peyer'schen Plaques) des Impflings kolonisieren ohne jedoch Krankheitssymptome auszulösen (Sirard *et al.*, 1999). Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz lebender humanpathogener Mikroorganismen ist die Herabsetzung der Virulenz und Pathogenität der Trägerstämme durch genetische Manipulationen des Erbguts. Hierbei sollten mindestens zwei genetisch voneinander unabhängige attenuierende Mutationen im Genom eingefügt werden, um eine eventuelle Reversion zum Wildtyp durch Rekombinationsereignisse zu vermeiden (Charles und Dougan, 1990). Der so erzeugte Impfstamm sollte aber immer noch die Peyer'schen Plaques kolonisieren können und eine effiziente mukosale Immunantwort auslösen, ohne jedoch Krankheitssymptome zu verursachen. Außerdem sollte die Impfung möglichst durch eine einmalige orale Gabe der Vakzine erfolgen können. Bisher wurden viele Studien durchgeführt, in denen die Wirksamkeit rekombinanter, attenuierter *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* Stämme in Mäusen demonstriert wurde (Pasetti *et al.*, 2003). Jedoch zeigen klinische Studien, die größtenteils attenuierte Serovar Typhi-Stämme als Träger einsetzen, dass bei der Entwicklung heterologer *Salmonella*-Vakzinstämme noch einige Optimierungsarbeit zu leisten ist (Garmory *et al.*, 2002).

Der erste zugelassene Humanvakzinstamm *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21A (Germanier und Fuer, 1975) ging aus einer ungerichteten chemischen Mutagenese hervor

und wird als Vivotif® von der Berna-Biotech AG vertrieben. Da jedoch drei bis vier Immunisierungen nötig sind, um einen etwa 50% bis 80% Schutz gegen eine Infektion mit Typhi zu erhalten, ist dieser Stamm suboptimal. Aufgrund von Sicherheitsaspekten und einer besseren Qualitätskontrolle müssen diese Modifikationen heutzutage durch definierte genetische anstelle der früher verwendeten stochastischen Mutationen erfolgen (vgl. Tab. 1). Klassischerweise wurde in vielen Studien der Chorismatbiosyntheseweg inaktiviert. Hoiseith und Stocker (1981) zeigten, dass eine Mutation im *aroA* Gen, das für die 3-Enolpyruvylshikimat-5-Phosphat-Synthase codiert, zur Auxotrophie des *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Stammes SL3261 für alle aromatischen Aminosäuren führte und die Virulenz in Mäusen stark verringerte. Auf dieser Basis wurden der Human-Vakzinstamm CVD908 aus Typhi Ty2 (Hone *et al.*, 1991) und der Stamm CVD906 aus Typhi ISP1820 (Hone *et al.*, 1992) durch Deletion von *aroC* und *aroD* entwickelt. Beide Stämme verursachten jedoch in klinischen Studien bei einigen Probanden entweder Fieber (Hone *et al.*, 1992) oder eine Bakteriämie (Tacket *et al.*, 1992b). Durch Einführung einer zusätzlichen Mutation in dem Gen *htrA*, das für eine periplasmatisch lokalisierte Protease codiert, wurde der Stamm CVD908-*htrA* konstruiert, der sich in klinischen Studien als sicher und immunogen erwies (Tacket *et al.*, 1997b).

Der Vakzinstamm Typhi Ty800, ein Derivat von Typhi Ty2, enthält Deletionen in *phoPQ*, einem Zwei-Komponentensystem, das die extrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration misst und auch zu der Überlebensfähigkeit von *Salmonella* in Makrophagen beiträgt (Groisman, 2001). Dieser Stamm erwies sich in klinischen Studien nebenwirkungsfrei und immunogen (Hohmann *et al.*, 1996). Ein *Typhimurium*-Stamm mit den analogen Deletionen in *phoPQ* erwies sich ebenfalls als geeignet (Angelakopoulos und Hohmann, 2000). Wurden die *Helicobacter pylori* Antigene Urease A und Urease B in den beiden letzt genannten Stämmen synthetisiert (Angelakopoulos und Hohmann, 2000; DiPetrillo *et al.*, 1999), erwies sich der *Typhimurium*-Stamm als etwas effizienter (Angelakopoulos und Hohmann, 2000).

Ein weiterer Stamm (χ 3927) wurde durch Mutationen im *cya*- (zyklische Adenylatcyclase) und *crp*-Gen (zyklisches AMP Rezeptorprotein) aus Typhi Ty2 hergestellt, musste aber aufgrund von Nebenwirkungen (Tacket *et al.*, 1992a) zusätzlich durch Mutation des *cdt*-Gens attenuiert werden. Dieses Gen ist an der Kolonisierung tiefer gelegener Organe mit beteiligt (Kelly *et al.*, 1992). Der daraus hervorgegangene Stamm χ 4073 wurde von Probanden gut toleriert (Tacket *et al.*, 1997a).

Vakzinstamm	Mutation	Klinische Symptome	Bakteriämie	Immunantwort
χ3297	$\Delta cya, \Delta crp,$	Fieber	+	moderat
χ4073	$\Delta cya, \Delta crp, \Delta cdt$	gut toleriert	-	moderat
CVD906	$\Delta aroC, \Delta aroD$	Fieber	-	stark
CVD908	$\Delta aroC, \Delta aroD$	gut toleriert	+	stark
CVD908- <i>htrA</i>	$\Delta aroC, \Delta aroD, \Delta htrA$	gut toleriert	-	stark
Ty800	$\Delta phoP, \Delta phoQ$	gut toleriert	-	stark
Ty21A	nicht definiert	gut toleriert	-	stark

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene attenuierte Typhi Vakzinstämme. Bis auf CVD906, hervorgegangen aus Typhi ISP1820, haben alle Stämme Typhi Ty2 als Parentalstamm. (Tabelle modifiziert nach (Levine *et al.*, 2001)).

Insgesamt betrachtet wurden beim Einsatz der beschriebenen Vakzinstämme als Träger für rekombinante Antigene aus verschiedenen Pathogenen bisher nur unbefriedigende Immunantworten in menschlichen Probanden erzielt. Weitere Verbesserungen der Stämme sind deshalb dringend nötig.

Neben der Wahl eines geeigneten Trägerstamms spielt die Art des Expressionssystems eine immense Rolle bei der Entwicklung von heterologen *Salmonella*-Lebendvakzinen. Dies beinhaltet die Option, ob das Gen für das heterologe Antigen in das Chromosom des Trägerstamms oder in ein Expressionsplasmid integriert werden soll. Im Fall plasmidcodierter Antigene muss gewährleistet sein, dass das Plasmid während der Kolonisierung des Impflings nicht verloren geht. Diese Gefahr besteht, wenn man Plasmide mit hoher Kopienzahl verwendet oder zu hohe Mengen des Antigens synthetisiert werden. Dies kann außerdem die "fitness" des Impfstamms erheblich beeinträchtigen, was eine suboptimale Immunantwort zur Folge haben kann (Galen und Levine, 2001). Abhilfe lässt sich durch die Verwendung von Plasmiden mit niedriger Kopienzahl schaffen (Galen und Levine, 2001) oder durch regulierte Expression des Antigens durch Promotoren, die erst während der Infektion induziert werden (Bumann, 2001b).

Ein anderer wichtiger Parameter scheint die Lokalisation des Fremdantigens in der *Salmonella*-Zelle zu sein (Galen und Levine, 2001). So wird diskutiert, dass zelloberflächenlokalisierte oder sekretierte Antigene im Hinblick auf die Induktion einer CD4⁺-T-Zell-Immunantwort, immunogener sind als cytoplasmatische Antigene (Kaufmann und Hess, 1999).

So wurde in einer *in vitro* Studie mit rekombinanten *E. coli* und *Salmonella*-Vakzinstämmen ein Modellepitop an unterschiedliche Positionen von LamB gekoppelt (Wick *et al.*, 1994a). Das Epitop wurde so entweder auf der Zelloberfläche oder Periplasma präsentiert. Das

Gesamtantigen wurde im Cytoplasma dargestellt. Nach voller Induktion der Antigen-Synthese der Stämme im Kulturmedium wurden Makrophagen infiziert und anschließend erfolgte eine Co-Inkubation mit einem Epitop-spezifischen T-Zellklon. Kein Lokalisationseffekt der Antigene bei der Induktion einer T-Zellantwort war feststellbar, da durch jeden Stamm eine ähnliche Antwort gemessen wurde. Dabei handelt es sich aber vermutlich um ein Artefakt, da die meisten Bakterien zu Beginn der Infektion durch die Makrophagen abgetötet werden (Buchmeier *et al.*, 1997). Dadurch kam es zu einer massiven Freisetzung von Antigenen, unabhängig wo es lokalisiert war und die resultierende T-Zellantwort wurde davon wahrscheinlich dominiert.

In einer *in vivo* Studie wurde gezeigt, dass nach oraler Verabreichung von *Salmonella*-Impfstämmen, die Listeria Antigene sekretierten, Schutz gegen eine Belastungsinfektion mit *Listeria monocytogenes* vermitteln, während die cytoplasmatische Darstellung der Antigene keinen protektiven Effekt hatte (Hess *et al.*, 1996a). Schützende T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) konnten nach einer intravenösen Immunisierung von Tieren mit Antigen-sekretierenden Stämmen aus den Milzen isoliert werden, die nach adoptiven Transfer Schutz gegen eine Belastungsinfektion lieferten. Die Probleme bei der Interpretation dieser Daten sind jedoch vielfältig. Zum einen sind T-Zellantworten Dosis-abhängig (Zinkernagel *et al.*, 1997) und die Beobachtungen könnten Artefakte sein, da die Antigen-Mengen, die ein Ergebnis von Synthese und Abbau sind, in den verschiedenen Stämmen *in vivo* unterschiedlich sein könnten. Zum anderen wurden die schützenden CD4⁺-T-Zellen nach intravenöser Immunisierung gewonnen, was nichts über die Induktion von protektiven CD4⁺-T-Zellen nach oraler Verabreichung von *Salmonella*-Vakzinstämmen aussagt. Die initiale Antigenmenge in den Impfstämmen ist ein weiterer kritischer Punkt; da hohe Antigenmengen in den Bakterien *in vitro* produziert wurden und im weiteren Immunisierungsverlauf die tatsächliche Antigen-Menge viel kleiner sein könnte. Somit ist Gesamt-T-Zellantwort das Resultat der frühen Antwort gegen die Antigenmenge im Inokkulum, die im Fall des Antigen-sekretierenden Stamms höher war. Insgesamt betrachtet herrscht also immer noch Unklarheit, ob die Antigenlokalisierung tatsächlich einen Einfluss auf die CD4⁺-T-Zellantwort hat.

Für die Auslösung humoraler Immunantworten durch *Salmonella*-Vakzinstämme gibt es Evidenzen, dass zelloberflächenlokalisierte oder sekretierte Antigene höhere Antikörpertiter bewirken können als periplasmatische oder cytoplasmatische (Chen und Schifferli, 2000; Haddad *et al.*, 1995; Kang und Curtiss, III, 2003). Der fehlende Vergleich der Kolonisierungskapazität der unterschiedlichen Stämme (Chen und Schifferli, 2000; Kang und Curtiss, III, 2003) mindert zum Teil deren Aussagewert, da ein Wirksamkeitsunterschied nur auf einer unterschiedlichen "fitness" der Vakzinstämme beruhen könnte.

Die Oberflächenpräsentation von Antigenen wurde bisher durch verschiedene Trägerproteine erzielt. Dies beinhaltet die Benutzung von Proteinen der äußeren Membran

aus *E. coli*, wie OmpA (Haddad *et al.*, 1995), PhoE (Janssen und Tommassen, 1994; Tommassen *et al.*, 1993), LamB (Charbit *et al.*, 1988; Hayes *et al.*, 1991; Leclerc *et al.*, 1989), P87 Fimbrien (Chen und Schifferli, 2000) , oder dem Ice Nucleating Protein aus *Pseudomonas aeruginosa* (Lee *et al.*, 2000), der Flagellenkomponente FliC aus *Salmonella* (De Almeida *et al.*, 1999; Newton *et al.*, 1989) oder dem *Salmonella* Autotransporter MisL {Ruiz-Perez, 2002 16 /id. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Oberflächenpräsentation von B- und T-Zell-Epitopen des p60 Proteins aus *Listeria monocytogenes* durch das TolC Protein aus *E. coli* einen protektiven Effekt hatte {Spreng, 2003 76 /id}. Viele dieser Systeme zeigen gewisse Nachteile, wie die tolerierbare Insertionsgröße der Antigene (Cornelis, 2000) oder eine korrekte Antigenpräsentation nur bei bestimmten Temperaturen (Lee *et al.*, 2000a). Zudem konnten bei einigen Systemen spezifische humorale Antworten nur nach intravenöser oder intraperitonealer, aber nicht nach oraler Verabreichung der rekombinanten *Salmonella*-Lebendimpfstoffe induziert werden (De Almeida *et al.*, 1999; Hayes *et al.*, 1991; Janssen und Tommassen, 1994; Leclerc *et al.*, 1989). Fraglich ist weiterhin, ob die induzierten Antikörper auch schützend gegen die jeweiligen Pathogene waren, da, bis auf Ausnahmen (Spreng *et al.*, 2003), keine wirkliche Protektion nach den Immunisierungen demonstriert werden konnte.

Die problematischen Punkte bei den bisherigen Studien sind somit vielfältig. Für die Anwendung als oraler Impfstoff müssen die rekombinanten Stämme unbedingt nach der oralen Verabreichung eine Immunantwort induzieren können. Außerdem sollten die Präsentationssysteme so weit ausgereift sein, dass größere Antigenfragmente inseriert werden können.

Bei vergleichenden Studien zum Einfluss der Antigenlokalisierung ist es außerdem von entscheidender Bedeutung, dass die Synthese der Antigene erst im Verlauf der Besiedelung erfolgt; dadurch wird gewährleistet, dass die Gesamt-Immunantwort nicht durch die frühe Antwort gegen die Antigenosis im Inokkulum dominiert wird. Zusätzlich muss bei diesem Vorgehen aber die Proteinmenge des Antigens, die ein Resultat aus Synthese und Abbau ist, in den verschiedenen Stämmen vergleichbar sein, da die Immunantwort Dosis-abhängig ist. So werden cytoplasmatische Proteine beispielweise durch die ClpX Protease degradiert, während Proteine der äußeren Membran zum Teil durch OmpE abgebaut werden. Bei bisherigen Studien war über die Dynamik der verwendeten Promotoren während der Kolonisierung der Versuchstiere nichts bekannt und eventuelle Wirksamkeitsunterschiede der eingesetzten Stämme könnten damit auf einer unterschiedlichen Antigen-Gesamtdosis beruhen. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Interpretation der Ergebnisse ist die unterschiedliche Sequenzumgebung der antigenen Determinanten, die einen maßgeblichen Einfluss bei der Auslösung einer Immunantwort haben kann (Moudgil *et al.*, 1998). So

müssen unterschiedliche Signalpeptide an die Test-Antigene fusioniert werden oder die antigenen Determinanten werden an unterschiedliche Positionen eines Trägerproteins fusioniert, um deren Lokalisierung im gewünschten Kompartiment der *Salmonella*-Zelle zu erzielen. Dies hat eine Präsentation der Determinanten in verschiedenen Sequenzumgebungen zur Folge, die wiederum die Stärke der induzierten Immunreaktionen beeinflussen können. Die entscheidenden frühen Induktionsereignisse sind in normalen Versuchstieren nur schwer zu untersuchen, weil die Konzentration der antigenspezifischen CD4⁺-T-Vorläuferzellen sehr gering ist. Deshalb wurden in den früheren Arbeiten die späten Effektor T-Zellen analysiert, um Rückschlüsse auf einen eventuellen Einfluss der Antigene in verschiedenen Kompartimenten der bakteriellen Zelle auf die CD4⁺-T-Zellantwort zu ziehen. Die späten Antworten sind jedoch ein Resultat komplexer Interaktionen verschiedener Zellpopulationen (Shedlock und Shen, 2003) und geben nicht die Situation während der frühen Induktionsphase wieder.

Die Oberflächenexposition von Antigenen in *Salmonella*-basierten Lebendimpfstoffen scheint aber insgesamt betrachtet keinen Nachteil zu bergen. Der Einfluss auf die wichtige CD4⁺-T-Zellantworten wurde aber bisher nur wenig untersucht und die kontroversen Daten erlauben keinen Schluss, dass die Oberflächenpräsentation antigenen Determinanten eine tatsächlich bessere Wirkung hat.

Die Aufklärung der Frage, ob eine Optimierung von rekombinanten *Salmonella*-Lebendvakzine durch die Darstellung von Antigenen in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten erzielbar ist, stellt einen wichtigen Schritt bei der Weiterentwicklung wirksamer *Salmonella*-basierter Impfstoffe dar. Dies ist dringend erforderlich, weil die Resultate der bisher durchgeführten Humanstudien nicht befriedigend waren.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Die Arbeitshypothese, dass die Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche von *Salmonella*-Lebendimpfstoffen deren Effizienz erhöht, diente als Leitfaden für die durchgeführten Experimente.

Teilziel 1:

Hier sollte die Hypothese für CD4⁺-T-Zellen mit einem definierten Modellsystem validiert werden. Dazu wurde das transgene T-Zell-Rezeptormodell für das OVA-Epitop gewählt, um die oben genannten Probleme zu vermeiden. Das Epitop wurde in verschiedenen

Kompartimenten der *Salmonella*-Zelle dargestellt und ein Vergleich der T-Zellantworten sollte Aufschluss geben, ob die unterschiedliche Lokalisation von Antigenen einen Effekt auf die frühe zelluläre Immunantwort hat.

Teilziel 2:

Mit den Ergebnissen aus dem OVA-Modell sollte ein geeignetes Präsentationssystem ausgewählt werden und ein Test mit einem anderen Antigen sollte Aufschluss bringen, ob auch bewaffnete Effektorzellen nach Immunisierung erzeugt werden können.

Hierzu sollten rekombinante Vakzinestämme entwickelt werden, die ein CD4⁺-T-Zell-Epitop des Hsp60-Hitzeschockproteins aus *Yersinia enterocolitica* synthetisieren, und die T-Zellantwort nach Vakzinierung ausgewertet werden.

Teilziel 3:

Des Weiteren sollte die Arbeitshypothese durch Analyse der Schutzwirkung in einem *Helicobacter pylori* Infektionsmodell validiert werden.

Dieses Modell wurde ausgewählt, da dort der Protektionsmechanismus hauptsächlich auf CD4⁺-T-Zellen beruht. Nach Vakzinierung mit rekombinanten *Salmonella*-Stämmen, die ein *H. pylori*-Antigen darstellen, erfolgt eine Belastungsinfektion. Die Auswertung der *H. pylori*-Besiedlung im Magen infizierter Tiere gibt dann Aufschluss über die Wirksamkeit der Vakzine.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mäuse

Name	Genotyp/Referenz
DO11.10	B10.D2-Hc ^T H2 ^d H2-T18 ^c /nSnJ-Tg(DO11.10)10Dlo/J (Murphy <i>et al.</i> , 1990)
F1 DO11.10 x BALB/c	Zucht durch Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BALB/c	Zucht durch Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin

2.1.2 Bakterienstämme

Escherichia coli Stämme

Name	Genotyp	Referenz
DH5 α	<i>De oR, endA1, gyrA96, hsdR17(r_k-m_{k+}), recA1, relA1, supE44, λthi-1, Δ(lacZYA-argFV169)</i>	NEB
UT5600	F-, <i>ara-14, leuB6, azi-6, lacY1, proC14, tsx-67, entA403, trpE38, rfbD1, rpsL109, xyl5, mtl-1, thi-1, Δ(ompT-fepC)</i>	
JK321	F-, <i>ara-14, leuB6, azi-6, lacY1, proC14, tsx-67, entA403, trpE38, rfbD1, rpsL109, xyl5, mtl-1, thi-1, Δ(ompT-fepC) zih::Tn10 dsbA::kan</i>	(Jose <i>et al.</i> , 1996)

Salmonella enterica serovar *Typhimurium* Stämme

CREA#	Genotyp	Referenz
0293	ATCC 14028s CDC-6516-60, Δ aroA	(Kramer <i>et al.</i> , 2003a)
1283	SL3261, Δ aroA	(Hoiseth und Stocker, 1981); Freissler. E.A., nicht veröffentlicht
1294	SL3261, Δ aroA, Δ thyA	(Hoiseth und Stocker, 1981); Freissler. E.A., nicht veröffentlicht
1323	ATCC 14028s CDC-6516-60, Δ aroA, <i>thyA</i>	(Kramer <i>et al.</i> , 2003a)

:: Integration in das Genom an der zuvor genannten Stelle

Helicobacter pylori Stamm

Stamm	Beschreibung	Referenz
P76	Streptomycin resistentes Derivat von P49	(Gomez-Duarte <i>et al.</i> , 1998)

2.1.3 Zelllinien

Die verwendete Zelllinie wurde von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“, Abt. Mensschliche und Tierische Zellkulturen (Braunschweig) bezogen.

J-774A.1 (DMSZ ACC170)

Monocyten-Makrophagen, die 1968 von einem Tumor einer weiblichen BALB/c Maus etabliert wurden.

2.1.4 Nährmedien

Medien und Zusätze für die Bakterienanzucht

E. coli

LB Medium Luria Bertani Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1 Liter VE-H₂O

Agarplatten Das jeweilige Medium wurde mit 1,5% Agar (Difco) versetzt.

Salmonella

Soja-LB Medium 10 g Soja-Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1 Liter VE-H₂O

5 x M9 64 g Na₂HPO₄ · 7xH₂O, 15 g KH₂PO₄, 2,5 g NaCl, 5 g NH₄Cl in 1l VE-H₂O lösen, pH auf 7,2 einstellen, autoklavieren

2,3-Dihydroxybenzoesäure 50 mg 2,3-Dihydroxybenzoesäure in 2 ml 50%(v/v) EtOH lösen, sterilfiltrieren

Mg-Mangelmedium 200 ml 5 x M9, 1 ml 10 mM MgSO₄, 20 ml 20% (w/v) Glucose, 10 ml 0,4%(w/v) Histidin, 50 ml 10%(w/v) Casein, 2 ml 2,3-Dihydroxybenzoesäure-Lsg., ad 1l mit VE-H₂O auffüllen

H. pylori

BHI-Medium 37 g Brain-Heart-Infusion Medium ad 1 Liter VE-H₂O und autoklaviert

BHI-Komplettmedium 900 ml BHI-Medium, 100 ml iFCS, 100 µl Nystatin Stammlösung, 2 ml Trimetoprim Stammlösung und 1 ml Vancomycin Stammlösung

BHI-Agarplatten 36 g Agar-Base auf 900 ml auf VE-H₂O aufgefüllt und autoklaviert. Vor dem Gießen der Platten wurden 10 ml Vitamin-Mix, 100 ml Pferdeserum, 100 µl Nystatin Stammlösung, 2 ml Trimethoprim Stammlösung und 1 ml Vancomycin Stammlösung zugefügt.

Vitaminmix 100 g Dextrose, 10 g L-Glutamin, 25,9 g L-Cystein, 0,1 g Cocarboxylase, 0,02 g Fe(NO₃)₃, 0,03 g Thiamin, 13 mg, 0,25 g Diphosphopyronukleotid/NAD, 0,01 g Vitamin B12 gemeinsam in 500 ml VE-H₂O lösen, hierzu eine Lösung aus 1,1 g L-Cystin, 1 g Adenin, 0,03 g Guanin, 0,5 g Uracil, 0,15 g Arginin, 13 mg p-Aminobenzoesäure in 15 ml konzentrierter HCl geben, ad 1 Liter VE-H₂O, sterilfiltrieren, bei -20°C bis zur weiteren Verwendung lagern.

MATERIAL & METHODEN

Einfriermedium 70% BHI-Medium, 20% Glycerin, 10% iFCS

Antibiotika

Ampicillin	Stammlösung 100 mg/ml in VE-H ₂ O, Arbeitskonzentration 100 µg/ml (<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>)
Streptomycin	Stammlösung 400 mg/ml in VE-H ₂ O, Arbeitskonzentration 400 µg/ml (<i>H. pylori</i>) Stammlösung 90 mg/ml in VE-H ₂ O, Arbeitskonzentration 90 µg/ml (<i>Salmonella</i>)
Thymin	Stammlösung 200 mg/ml in VE-H ₂ O, Arbeitskonzentration 50 µg/ml (<i>Salmonella</i>)
Kanamycin	Stammlösung 50 mg/ml in VE- H ₂ O, Arbeitskonzentration 50 µg/ml (<i>Salmonella</i>)
Nystatin	Stammlösung 10 mg/ml in DMF, Arbeitskonzentration 1 µg/ml (<i>H. pylori</i>)
Trimetoprim	Stammlösung 2,5 mg/ml in DMF, Arbeitskonzentration 5 µg/ml (<i>H. pylori</i>)
Vancomycin	Stammlösung 10 mg/ml in VE-H ₂ O, Arbeitskonzentration 10 µg/ml (<i>H. pylori</i>)

Medien und Zusätze für die Zellkultur

RPMI-H	RPMI 1640 Medium mit 2 mM Glutamin und 25 mM HEPES
RPMI	RPMI 1640 Medium mit 2 mM Glutamin
FCS	Fetales Kälberserum (Seromed, Biochrom KG)
iFCS	durch 10 min Inkubation bei 65 °C inaktiviertes FCS
PS	Pferdeserum (E&O Laboratories)
Gentamycin	Stammlösung 10 mg/ml in VE-H ₂ O, Arbeitskonzentration 10 µg/ml

2.1.5 Plasmide

In der folgenden Liste sind die wichtigsten Konstrukte und Klonierungsvektoren dargestellt

Plasmid	Kurzbeschreibung	Referenz
pBAD18	Klonierungsvektor mit Arabinose induzierbarem Promotor, Amp ^r	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pLAT260	ha-ctB-aida, P _{TK}	(Kramer <i>et al.</i> , 2003a)
pEGE50	ha-aida, P _{TK}	
pEGE267	ureA ₂₇₋₅₃ –ctB-aida, P _{pagC} , thyA	
pEGE270	ureA ₇₄₋₉₅ – ctB-aida, P _{pagC} , thyA	
pEGE274	ureA ₂₀₉₋₂₃₀ –ctB-aida, P _{pagC} , thyA	
pMW57	gfp_ova, P _{pagC} , RBS _{original}	
pMW123	gfp_ova, P _{pagC} , RBS _{Mut57}	
pKRI11	ova-ha-ctB-aida	diese Arbeit
pKRI13	lpp+ (Wildtyp), pBAD18	diese Arbeit
pKRI14	lpp1 (<i>Bgl</i> II Schnittstelle vor terminalen Lysincodon), pBAD18	diese Arbeit
pKRI15	lpp2 (<i>Bgl</i> II Schnittstelle nach terminalen Lysincodon), pBAD18	diese Arbeit
pKRI16	lpp3 (<i>Bgl</i> II Schnittstelle anstelle des terminalen Lysincodons), pBAD18	diese Arbeit
pKRI19	ova-ha-ctBaida, thyA, P _{phoP}	diese Arbeit
pKRI22	ha-ctB-aida, thyA, P _{TK}	diese Arbeit

MATERIAL & METHODEN

Plasmid	Kurzbeschreibung	Referenz
pKRI24	ova-ha-ctB-aida, <i>thyA</i> , P_{TK}	diese Arbeit
pKRI25	mgIB (ohne Signalpeptid-Sequenz) , pBAD18	diese Arbeit
pKRI26	lpp2-ha, pBAD18	diese Arbeit
pKRI27	lpp2-ova-ha, pBAD18	diese Arbeit
pKRI28	lpp3-ha, pBAD18	diese Arbeit
pKRI29	lpp3-ova-ha, pBAD18	diese Arbeit
pKRI33	lpp1-ova-ha, pBAD18	diese Arbeit
pKRI36	ha-ctB-aida, P_{phoP} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI41	ova- ha-ctB-aida, P_{phoP} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI43-45	hsp60-ha-ctB-aida, P_{TK} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI46,47	lpp1-ha, pBAD18	diese Arbeit
pKRI61,62	ha-aida, P_{phoP} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI64	ha-mgIB, pBAD18	diese Arbeit
pKRI63	ova-ha-mgIB, pBAD18	diese Arbeit
pKRI65,66	ova -ha-ctB-aida, P_{paqC} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI71,72	gfp-ova, P_{phoP} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI73,74	gfp-ova, P_{paqC} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI77,78	ha-aida, P_{phoP} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI81,83-86	gp1-ha-ctB-aida, P_{phoP} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI79	gp1-ha-ctB-aida, P_{TK} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI80	ova-gp1-ha-ctB-aida, P_{TK} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI82,87	gp1-ha-aida, P_{phoP} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI89-92	mislocalized lpp	diese Arbeit
pKRI93-95	(gp1) ₂ -ha-ctB-aida, P_{phoP} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI114-118	(gp1) ₃ -ha-ctB-aida, P_{phoP} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI119	(gp1) ₄ -ha-ctB-aida, P_{phoP} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI138-141	<i>ureA</i> (gly27)-ha-aida, P_{phoP} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI143	<i>ureA</i> (gly27)-ha-aida, P_{paqC} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI155	<i>ureA</i> , P_{paqC} <i>thyA</i> ,	diese Arbeit
pKRI171	ova-ha-ctB-aida, P_{paqC} , RBS _{Mut1} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI172	ova-ha-ctB-aida, P_{paqC} , RBS _{Mut2} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI173	ova-ha-ctB-aida, P_{paqC} , RBS _{Mut6} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI174	ova-ha-ctB-aida, P_{paqC} , RBS _{original} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI175	ova-ha-ctB-aida, P_{paqC} , RBS _{Mut17} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI176	ha-ctB-aida, P_{paqC} , RBS _{Mut17} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI177	ha-ctB-aida (RBS _{Mut17}), gfp_ova(RBS original), P_{paqC} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI181	lpp3-ova-ha, P_{paqC} , RBS _{Mut1} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI182-183	lpp3-ova-ha, P_{paqC} , RBS _{Mut2} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI178-180	ctBL-ova-ha-mgIB, P_{paqC} , RBS _{Mut17} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI186	ctBL-ova-ha-mgIB, P_{paqC} , RBS _{Mut2} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI184,185	lpp3-ova-ha, P_{paqC} , RBS _{Mut17} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI187	ctBL-ova-ha-mgIB, P_{paqC} , RBS _{Mut1} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI188	ctBL-ova-ha-mgIB, P_{paqC} , RBS _{Mut6} , <i>thyA</i>	diese Arbeit
pKRI189	ctBL-ova-ha-mgIB, P_{paqC} , RBS _{original} , <i>thyA</i>	diese Arbeit

MATERIAL & METHODEN

Oligo-name	Sequenz (5'-3')	Orientierung
KRI41	GATCTTTCTAGATTACTTGCGGTATTTAGTA	-
KRI42	GATCTTTCTAGATCAAGATCTCTTGCGGTATTTAGTAGC	-
KRI43	GATCTTTCTAGATCACTTAGATCTGCGGTATTTAGTAGCCAT	-
KRI44	GATCTTTCTAGATCAAGATCTGCGGTATTTAGTAGCCAT	-
KRI46	GATCGTCGACTCAGAAGCTGTATTTTATC	-
KRI45	GATCGTCGACTTGACAGCTTATCATCGAT	+
KRI47	GGGGGGCTAGCTAAGGATGAATTATGATTAA	+
KRI48	GATCGGTACCTAGAGGGTATTAATAATGAAAGCTA	+
KRI49	GATCGGATCCGAATCTCTGAAAATCTCTC	+
KRI50	GATCGGATCCGGAAGATCTGGCCAATTG	+
KRI51	GATCGGATCCGTAATCTGGCACGTCGT	-
KRI52	GATCGGATCCTCTTATCCATACGACGTG	+
KRI53	GGGGGGCTAGCTAAGGATGAATTATGATTAA	+
KRI54	CGCTGAATTCGGGACTTAC	+
KRI55	CATGGTGAAGTCCCGAATTCAGCGAGCT	-
KRI56	GTCACGGGAGCAATGC	+
KRI57	TTGATTTCA GCG TGA GCA	-
KRI58	GATCTGAAGTGGCATCTGATACACCTCATCCTGCAAGAATTGGTCTGAAT TGCCAGCTGGCTC	+
KRI59	AATTGAGCCAGCTGGCAATTCAGACCAATTCTTGCAGGATGAGGTGTATC AGATGCCACTTCA	-
KRI60	CTAGCTAAGGATGAATTATGAGATCTA	+
KRI61	CTAGTAGATCTCATAATTCATCCTTAG	-
KRI62	ATTCTTGCAGGATGAGGT	-
KRI63	GATCTGAAGTGGCATCTGATACACCTCATCCTGCAAGAATTGGTCTGAAT TGCCAGCTGGCTC	+
KRI64	TTTTTTCTAGATAAGGATGAATTATGATTAAA TT	+
KRI65	TTTTTTCCATGGTCAGAAGCTGTATTTTATCC	-
KRI66	AATTTGAAGTGGCATCTGATACACCTCATCCTGCAAGAATTGGTCTGAATT GCCAGCTGGCTC	+
KRI67	CTAGCTAAGGATGAATTATGAGATCTCCGGAATACTTCAAAA	+
KRI68	CTAGTTTTGAAGTATTCGGGAGATCTCATAATTCATCCTTAG	-
KRI69	AATTTCTTGAACAACCTGGAGTCAATTATTAATTCGAAAACTGACAGAAT GGACATCAC	+
KRI70	AATTGTGATGTCCATTCTGTCAGTTTTTCGAAATTAATAATTGACTCCAGTT GTTCAAGA	-
KRI71	GGCAGGTTGCGATAGCAACGCTA	+
KRI72	TAGCGTTGTATCGCAACCTGCC	-
KRI73	ACCAATTGTCCATATTGCA	+
KRI74	TCTCATGAGCGGATACAT	-
KRI75	ACATAACCACACAAAGTATAATGTTATTGTTATGAACCGTACTAGTGTAGG CTGGAGCTG CTTC	+
KRI76	TGCGTCAAATTATTTACAGATGCGGAATACTTTGTTGTCCCATATGAATAT CCTCCTTAG	-
KRI77	GTGTAATACTTGTAAACGCTACATGGAGATTAACCTCAATCTGTGTAGGCTG GAGCTGCTTC	+
KRI78	CTTACGGTATTTAGTAGCCTGGTTGTCCAGACGCTGGTTCATATGAATAT CCTCCTTAGT	-
KRI81	GATCTTTCTAGATAGCGGTAAACGGCAGA	+

Oligo-name	Sequenz (5'-3')	Orientierung
KOR_RBS3	GATCAATCTAGATTTAAGAAAGAGATATACATATGATTAATTTAAATTTGGTG	+
KOR_RBS4	GATCAATCTAGATTTAAGAAGCAGATATACATATGATTAATTTAAATTTGTG	+
KOR_RBS5	GATCAATCTAGATTTAAGAAGGGGATATACATATGATTAATTTAAATTTGTG	+
KOR_RBS6	GATCAATCTAGATTTAAGAAAGAAATATACATATGATTAATTTAAATTTGGTG	+
KOR_RBS7	GATCGGTACCTTTAAGAAAGAGATATACATATGAAAGCTACTAACTGG	+
KOR_RBS8	GATCGGTACCTTTAAGAAAGAAATATACATATGAAAGCTACTAACTGG	+
KOR_RBS9	GATCGGTACCTTTAAGAAGCAGATATACATATGAAAGCTACTAACTGG	+
LAT142	GATTCTCGAGGACGTCTAATGGGTTTTATAGCGAA	+
LAT143	ATGATCTCTAGACAACTCCTTAATACTACTTA	-
LAT149	GATTCTCGAGGACGTCTGGCAAATTATATCGGTCTG	+
LAT198	TCCCAGTATAATTTGACACG	-
LAT215	TTGTGAATCTATATGTTGACTACC	-
LAT63	GATCAGATCTACCTACTACTTCACGACCAGCTTCGTTGATTTTCAGCGTGA GCAGCGTGAACA	-
EF16	TGTA AACGACGGCCAGTATCACGAGGCCCTTTCGT	+
A3	GATCAGATCTAGACCAATGCTTAATCAGTGA	-

2.1.7 Antikörper und Antiseren

Antikörper/Antiserum	Herkunft	Modifikation/Arbeitskonzentration
anti-HA –Konjugat (IgG)	Maus, monoklonal	Meerrettichperoxidase, 1:500 (Roche, Mannheim)
anti-HA (IgG)	Maus, monoklonal	1:200 (Cell Signalling)
anti-OVA (IgG)	Kaninchen, polyklonal	1:1000 (Sigma)
anti-Cholera toxin (IgG)	Kaninchen, polyklonal	1:1000 (Sigma)
Ziege-anti-Kaninchen-Konjugat (IgG)	Ziege, polyklonal	Meerrettichperoxidase, 1:1000 (Sigma)
Ziege-anti-Maus-Konjugat (IgG)	Ziege, polyklonal	Cy3, 1:200 (Pharmingen)
Ziege-anti-Kaninchen-Konjugat (IgG)	Ziege, polyklonal	Alexa 546, 1:100 (Pharmingen)
anti-CD4 (IgG)	Hamster, monoklonal	FITC, 1:100 (Pharmingen)
anti-tgTCR clonotyp KJ1-26 (IgG)	Hamster, monoklonal	Biotin, 1:200 (Pharmingen)
α-B220 (IgG)	Hamster, monoklonal	Allophycocyanin, 1:50 (Pharmingen)

Antikörper/Antiserum	Herkunft	Modifikation/Arbeitskonzentration
Streptavidin		FarRed, 1:100 (Gibco)
anti-CD69	Hamster, monoklonal	Phycoerythrin, 1:25 (Pharmingen)
anti- <i>H. pylori</i> Glycin Extrakt (IgG)	Kaninchen, polyklonal	1:1000 (Zur Verfügung gestellt von A. Walduck)
anti- <i>Salmonella</i> -Serum	Kaninchen, polyklonal	1:100, (Weiland)

2.1.8 Häufig verwendetet Puffer und Lösungen

50 x TAE	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml EDTA, pH 8,0 ad 1l VE-H ₂ O
10 x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l VE-H ₂ O, pH7,4
3 M NaAc	24,61 g Na-Acetat in 100 ml VE lösen und pH 5,2 mit Eisessig einstellen
10 x TBS	157,43g Tris, 113,99g NaCl , mit HCl auf pH 7,5 einstellen

2.1.9 Chemikalien, Enzyme und Standards

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht ausdrücklich erwähnt von Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), ICN (Costa Mesa, USA) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe).

Enzyme: Alle Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas Deutschland GmbH (St Leon Rot) und New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland) bezogen. Taq DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech AG; Uppsalla, Schweden), Deep Vent Polymerase (NEB), T4-DNA Ligase (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Schottland), Alkalische Phosphatase (Roche, Mannheim), Klenow Fragment (MBI Fermentas). Die zugehörigen Puffer wurden jeweils von den Herstellerfirmen der Enzyme verwendet.

Für die Agarose Gelelektrophorese wurden die Längenstandards λ BstEII und peqlab Gold-Leiter-Mix (Peqlab) verwendet. Als Proteinmarker bei SDS-PAGE wurde der LMW Standard (Amersham Pharmacia) benutzt.

2.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Biolumat LB 9501 und LB9505 (Berthold), Brutschränke (Noaire, Heraeus), Digitales Photosystem (Intas Göttingen), Elektrophoreseapparaturen (BioRad), FACSsort und Zubehör (Becton Dickinson), Gasbrenner (Tecnomara, Hanau), Glaswaren (Schott, Brandt), Heizblöcke (Eppendorf, Grant Instruments), Kanülen und Einmalspritzen (Braun-Melsungen, Becton Dickinson), Kühl- und Gefrierschränke (Liebherr, Bosch, Colora), Küvetten (Sarstedt), Konventionelles Mikroskop (Zeiss, Olympus, Nikon, Leica), Konfokales Mikroskop Leica TCS NT (Leica), Maxisorb-Platten (Nunc), Magnetrührer (Heidolph), Magnetische Beads zur Zellselektion (Miltenyi), Nitrozellulose- und PVDF-Membran (Schleicher und Schüll), Objektträger (Resy) und Deckglaschen für die Mikroskopie (Micromed), Parafilm (American Can Company), Pipettierhilfen (Integra BioSciences, Hirschmann,

Roth), Plastikwaren (Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc, Sarstedt), Plastikwaren für die Zellkultur (Costar, Nunc, Greiner), pH Messgerät (Radiometer Kopenhagen), Photometer (Hach, Pharmacia Biotech), Röntgenfilme (Fuji, Kodak), Semi-Dry Elektroblot Apparatur (BioRad), Schüttler (New Brunswick), Sicherheitswerkbänke (Gelaire, Heraeus), Spannungsgeräte (BioRad), Ultraschallgerät (Branson Sonifier 450), Ultrazentrifuge (Beckmann). UV Lampen (Benda), Vortex (Bender & Hobein).

2.1.11 Software

Diese Arbeit wurde mit Hilfe folgender Software erstellt:

Microsoft Office 2000, Adobe Photoshop 6.0, Corel Draw 9, Prism 3.0, Clone Manager 6.0, Reference Manager 10, WinMDI 2.8.

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von Bakterien

E. coli und *Salmonella* Stämme wurden bei 37 °C je nach Experiment in dem entsprechenden Flüssigmedium bei 200 U/min bzw. auf den entsprechenden Agarplatten kultiviert. Bei Bedarf wurden die zur Selektion notwendigen Antibiotika zugesetzt.

Zum Anlegen von gefrorenen Aliquots für *H. pylori* Protektionsversuche wurden die entsprechenden Salmonellen-Stämme auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C üN inkubiert. Die Platten wurden am darauf folgenden Tag geerntet, Soja-LB Medium angeimpft ($OD_{600}=0,1$) und üN bei 28 °C und 100 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden geerntet, in einer Glycerin-Soja-LB Mischung aufgenommen (70% Soja LB, 30% Glycerin (v/v)), so dass die OD_{600} etwa 4 betrug, und Aliquots bei -70 °C eingefroren. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte durch Ausplattieren von gefrorenen Aliquots auf LB-Selektionsplatten.

Zum Anlegen einer Primärkultur von *H. pylori* wurde mittels einer Impföse von einer Glycerin-Stammkultur auf eine *H. pylori*-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C für 2-3 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen in einem gasdichten Behälter inkubiert. Die mikroaerophile Atmosphäre wurde mittels Campy-Gen Beutel (Oxoid) oder durch Begasen mit 5% O₂, 85% N₂ und 10% CO₂ erzeugt. Eine Sekundärkultur konnte auf *H. pylori*-Agarplatten oder in BHI-Komplettmedium herangezogen werden. Für eine Sekundärkultur auf *H. pylori*-Agarplatten wurde mittels Impföse einige Bakterienkolonien von der Primärkultur auf weitere *H. pylori*-Agarplatten überimpft, diese mit 100-150 µl BHI pro Platte versetzt und für 1-2 Tage inkubiert. Für eine Sekundärkultur in BHI-Komplettmedium wurden Bakterienkolonien von der Primärkultur in BHI suspendiert, mit dieser Suspension das Flüssigmedium mit einer OD von 0,1 angeimpft und über Nacht bei 150 U/min inkubiert. Die entsprechenden Zusätze und Antibiotika wurden nach Bedarf hinzugegeben.

2.2.2 Nukleinsäure-Arbeitstechniken

2.2.2.1 Standardmethoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden in der Regel molekularbiologische Standardmethoden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Plasmid DNA wurde mit Hilfe des „Wizard Plus SV“ Kits von Promega (Mannheim, Deutschland) isoliert. Um größere Mengen an Plasmid DNA zu isolieren (Midi-Prep), wurde der AX-100 Kit (Machery und Nagel) verwendet. DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden mit dem „Ultra Clean“-Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, USA) isoliert.

Transformation von *E. coli* und *Salmonella* mit Plasmid DNA, PCR-Produkten und Ligationsansätzen erfolgte durch Elektroporation (2,5 kV, 200 Ω , 25 μ F) mittels „Gene Pulser“ (Biorad).

2.2.2.3 Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen

Zur Entfernung von Taq-Polymerase und Restriktionsenzymen aus Reaktionsansätzen wurde die Strataclean-Matrix (Stratagene, Amsterdam, Holland) gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.3 Ethanolfällung

Die Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von 2,5 Volumen absolutem Ethanol und 0,5 Volumen 3 M Natriumacetat und Zentrifugation bei 13000 rpm für mindestens 30 min. Nach Verwerfen des Überstandes und Zugabe von 200 μ l Ethanol (70%, v/v), erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen VE gelöst.

2.2.2.4 Schnellpräparation von bakterieller chromosomaler DNA

Plasmidfreie *E. coli* oder *Salmonella* Stämme wurden geerntet und gescherte chromosomale DNA mittels „Wizard Plus SV“ Kit von Promega (Mannheim, Deutschland) isoliert, indem Schritte, die sanftes Invertieren der Reaktionsgefäße erfordern harsch gevortext wurde. Die dabei gewonnene DNA wurde für PCR Reaktionen eingesetzt.

2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) in 100-oder 50 μ l Reaktionsansätzen in Thermocyclern (Robocycler (Stratagene, Amsterdam, Holland); Perkin Elmer Gene Amp 2400 (Perkin Elmer)) mit folgenden Programm durchgeführt: 94 °C, 2min gefolgt von 35

Zyklen. 94 °C, 30 sec; 45-52 °C, 30-45 sec; 30 – 120 sec je nach Fragmentlänge. Danach wurden die Ansätze für 10 min bei 72 °C inkubiert, um alle begonnen Strangverlängerungen zu beenden.

Als Matrize wurde entweder gereinigte DNA oder eine Bakterien-Zellsuspension (1 Kolonie in 100 µl VE-H₂O) eingesetzt. Oligonukleotide wurden von Metabion (München, Deutschland) oder Invitrogen Life Technologies (Paisley, UK) bezogen. dNTP's stammen von MBI Fermentas (St. Leon rot, Deutschland).

Die PCR-Ansätze wurden in der Regel wie folgt angesetzt [Angabe der Endkonzentration]:

DNA bzw Zellsuspension	[1-20 ng] 1 µl aus 100 µl Gesamtvolumen
dNTP's	[125 µM]
Oligonukleotide	[1 pM]
PCR-Puffer	[1x]
MgCl ₂	[0,5-5 µM]
Taq Polymerase	[1-2 U]

2.2.2.6 Oligonukleotid-Hybridisierungen

Oligonukleotide (-70 bp, 100 µM) wurden 1:1 in Eppendorf-Reagenzgefäßen gemischt, in ein Becherglas mit kochendem Wasser transferiert 5 min bei 95 °C in einem Wasserbad denaturiert. Die Anlagerung der Oligonukleotide erfolgte während des Abkühlens des Becherglases bei RT für 1h. Die hybridisierten Oligonukleotide konnten anschließend direkt in Ligationsansätzen eingesetzt werden.

2.2.2.7 Deletionen chromosomaler Regionen mittels λ-Red System

Deletionen chromosomaler Regionen im *Salmonella* Stamm Crea0293 wurden mit dem von Datsenko und Wanner (2000) entwickelten System mit wenigen Modifikationen durchgeführt. Crea0293 wurde mit dem Plasmid pKD46, das für die λ Red Rekombinase codiert, transformiert. Aus dem Plasmid pKD4 wurde die Kanamycin-Resistenz-Kassette mittels PCR amplifiziert, wobei die (+)-und (-)- Strang Oligonukleotide an ihren (+) Enden zusätzlich DNA-Sequenzen enthielten, die mit dem zu deletierenden DNA-Abschnitt homolog sind. Die Transformation der Zellen wurde mit 1 ml PCR-Produkt (gefällt und in 10 µl VE-H₂O) durchgeführt. Die Eliminierung der Kanamycin-Resistenz-Kassette und Kurierung von den temperatursensitiven Plasmiden pKD46 und pCP20 erfolgte genau nach dem Protokoll von Datsenko und Wanner (2000).

2.2.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

2.2.3.1 Membranpräparationen (nach Nikaido *et al.*, 1994)

Bakterienzellen wurden in PBS suspendiert ($OD_{575}=10$) und durch Ultraschallbehandlung mit einem Branson Sonifier (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA) lysiert (30 Impulse (Dauer: 1s) maximale Intensität). Große Zelltrümmer und nicht-lysierte Zellen wurden durch milde Zentrifugation (5000 rpm, 5 min) abgetrennt. Um Gesamtmembranen anzureichern, wurde die Membranfraktion bei 14000 rpm für 30 min sedimentiert. Eine Anreicherung der äußeren Membran wurde durch Zugabe von L-Lauryl-Sarkosinat (1% w/v Endkonzentration) und anschließende Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 min erzielt. Durch Zugabe des Detergenz bleibt die Außenmembran weitgehend sedimentierbar, während Cytosol-, Periplasma- und Innenmembran-Bestandteile zum größten Teil solubilisiert werden.

2.2.3.2 Periplasmapräparation (nach Ames *et al.*, 1984, modifiziert)

Bakterienzellen wurden in 200 μ l 10 mM Tris (pH 8,0) suspendiert. 20 μ l Chloroform wurden hinzugegeben, gefolgt von 2 s vortexen. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT erfolgte eine erneute Zugabe von 200 μ l mM Tris (pH 8,0) und es wurde nochmals für 2 s gevortext. Abschließend wurde nach 10 min mit der Tischzentrifuge für 10 min bei 8500 rpm zentrifugiert. 100 μ l des Überstands wurden mit 100 μ l 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min gekocht.

2.2.3.3 Proteasebehandlung von Bakterien

Zellen wurden in PBS ($OD_{575}=5$) suspendiert und Trypsin (Endkonzentration 50 μ g/ml) hinzugefügt. Die Suspension wurde 10 min bei 37 °C inkubiert und das Trypsin durch zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS entfernt (5000 rpm, 5min). Die Zellen wurde direkt anschließend einer SDS-PAGE unterzogen oder es wurden Außenmembranen isoliert.

2.2.3.4 Trichloracetat-Fällung von Proteinen aus Lösungen

Für die Analyse von bakteriellen Proteinen im Kulturüberstand, wurden die Kulturen zunächst für 10 min bei 4 °C und 4600 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden durch 0,2 μ m Sterilfilter filtriert und das Filtrat auf sterile, bei 4 °C vorgekühlte 2 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Nach Zugabe von 100% (w/v) TCA (4 °C) zu einer Endkonzentration von 5% wurden die Proteine während einer 20 minütigen Inkubation auf Eis gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 16400 rpm, für 45 min bei 4 °C, wurden die Sedimente zweimal mit Aceton (-20 °C) gewaschen, anschließend bei RT getrocknet und in 1xSDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.2.3.4 SDS-PAGE

Die Auftrennung von mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturierten Proteinen durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) erfolgte nach Schägger oder Laemmli (Laemmli, 1970; Schägger und von Jagow, 1987).

2.2.3.5 Coomassie Färbung

Polyacrylamidgele wurden nach Beendigung der Elektrophorese für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in der Färbelösung (0,08% [w/v] Serva Blau G-250, 45% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Eisessig) inkubiert. Anschließend wurde das Gel kurz mit VE-H₂O gespült und dann in Entfärbelösung (33% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Eisessig) so lange inkubiert, bis sich der Hintergrund entfärbt hatte. Nach der Entfärbung wurden die Gele digital archiviert und anschließend zur Dokumentation auf einem Gelrockner getrocknet.

2.2.3.6 Silberfärbung, modifiziert (Blum *et al.*, 1987)

Zur Färbung von Proteinen mit Silbernitrat wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese 1 – 24 h bei Raumtemperatur in Fixierlösung (50% [v/v] Methanol, 12% [v/v] Eisessig, 0,037% [v/v] Formaldehyd) leicht schüttelnd inkubiert. Um das Methanol für die weiteren Schritte zu entfernen, wurde das Gel dreimal für 5 min mit 50% [v/v] Ethanol gewaschen, dann 1 min in einer 2 mM Thiosulfatlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser für jeweils 20 s wurde das Gel 20 min in einer Silbernitratlösung (24 mM AgNO₃, 0,0555% [v/v] Formaldehyd) inkubiert. Bevor die Proteine im Gel durch eine Entwicklerlösung (1,13 M Na₂CO₃, 0,08 mM Thiosulfat, 0,074% Formaldehyd) sichtbar gemacht wurden, musste das überschüssige Silbernitrat durch zweimaliges Waschen mit Wasser für jeweils 20 s entfernt werden. Um die Färbereaktion zu stoppen, wurde die Entwicklerlösung rasch durch eine Stopplösung (50 mM EDTA, pH 7 – 8) ersetzt. Hiernach wurden die Gele digital archiviert und anschließend zur Dokumentation auf einem Gelrockner getrocknet.

2.2.3.7 Western Blot Analyse

Zur immunologischen Analyse von Proteinen mit Antiseren wurden die Proteine nach dem Semidry-Verfahren bei 12 V für 1 h auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Als Transferpuffer, mit dem die Membran, das Gel und das Filterpapier (Fa. Whatman, Maldstone, GB) angefeuchtet wurden, diente 100 mM Tris, 100 mM Glycin, 20% Methanol, pH 7. Zur Absättigung der Membranen mit Protein wurden diese dann 15 min in M-PBS (5% Milchpulver in PBS) bei

Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Danach wurde der M-PBS verdünnte Primärantikörper hinzugegeben und gefolgt von einer einstündigen Inkubation. Nach 2 Waschschritten mit PBST (0,05% Tween in PBS) für je 5 min, erfolgte eine Inkubation für 1 h mit Meerrettich Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (in M-PBS verdünnt). Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit PBST für 10 min erfolgte die Detektion der Proteine mittels ECL-Kit (Amshersham). Die Dokumentation der Fluoreszenz erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilmen (X-OMAT-AR, Fa. Kodak AG, Stuttgart).

2.2.3.8 Immunfluoreszenzfärbung von Bakterien

2.2.3.8.1 Bakterien in Suspension

Bakterien wurden in PBS suspendiert, auf ein Deckglas aufgebracht und mit einer 2% Formalinlösung für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine Inkubation mit 0,2% BSA (in PBS) für 5 min blockiert. Die Antikörperinkubation erfolgte in PBS jeweils für 1 h. Ungebundene Antikörper wurden durch jeweils drei Waschschrritte für 5 min entfernt. Gebundene Antikörper wurden durch ein Antikörperkonjugat, an das ein Fluorophor gekoppelt war, nachgewiesen und das Präparat nach dreimaligem Waschen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.2.3.8.2 Intrazelluläre Bakterien

Mit *Salmonella* infizierte J-774-A.1 Zellen wurden mit 2% Formalin (in PBS) für 10 min bei RT. Eukaryotische Zellen wurden durch ein TBS-T (0,05% Tween 20 in TBS) Behandlung für 20 min permeabilisiert und unspezifische Antikörperbindungsstellen durch eine 30 minütige Inkubation in 5% Ziegen Serum-2% Maus Serum-TBS-T abgesättigt. Der 1. Antikörper (1:100, in 2% Ziegen Serum-2% Maus Serum-TBS-T) wurde für 1h appliziert, gefolgt von einem Waschriff mit TBS-T für 5 min. Der Fluorophor-gekoppelte zweite Antikörper (1:100, in 2% Ziegen Serum-2% Maus Serum-TBS-T) wurde ebenfalls 1 h appliziert. Nach drei Waschschrritten mit TBS-T für je 5 min, wurden die Präparate mit Moviol eingebettet und bei 4 °C dunkel gelagert.

2.2.3.8.3 Konfokale Mikroskopie

Die Analyse der Fluoreszenzfärbungen erfolgte mit Hilfe des konventionellen Fluoreszenzmikroskopes DMR oder des konfokalen Laser Scanning Mikroskops Leica TCS SP und dem dazugehörigen Programm TCS-NT. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem Krypton/Argon-Laser bei 488 nm und 546 nm angeregt und die emittierten Fluoreszenzsignale durch geeignete Kombinationen von Filtern und Spiegeln in zwei verschiedenen, für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe typischen Wellenlängenbereichen (Kanal 1: 515-545 nm, Detektion von FITC, GFP; Kanal 2: 585–615 nm,

Detektion von Alexa 546) detektiert. Ungefärbte Strukturen wurden mittels Durchlicht (DIC-Filter) sichtbar gemacht.

2.2.3.9 SDS-Sensitivität von Bakterien

Bakterien wurden in PBS suspendiert und die OD₅₇₅ auf 0,4 eingestellt. Nach Zugabe von SDS (Endkonzentration 0,1% w/v) wurden die Kulturen weiter bei 37 °C unter Schütteln mit 200 rpm inkubiert und die OD₅₇₅ in Intervallen gemessen.

2.2.3.10 Durchflußzytometrie von *in vitro* kultivierten *Salmonella*-Stämmen

Das Durchflußzytometer vereinzelt durch sein unter Druck stehendes Flüssigkeitssystem eukaryotische und prokaryotische Zellen und führt sie an einem Laserstrahl vorbei. Das auftreffende Laserlicht wird in zwei Richtungen gestreut: das nach „vorne“ (Forwardscatter FSC) und „zur Seite“ (Sidewardscatter SSC) abgelenkte Licht ist ein Maß für die Größe und Granularität der Zelle. Die Zellen werden also mit Hilfe dieser Parameter durch Setzen einer Auswahlregion (*gate*) von den übrigen, gemessenen Ereignissen abgegrenzt. Es werden für die weitere Analyse daher nur Meßsignale berücksichtigt, die von lebenden Zellen verursacht wurden. Außerdem regt der Laser die an Antikörper gekoppelten oder von Zellen exprimierte Fluorochrome an, deren Lichtemission ebenfalls quantifiziert werden kann.

Salmonellen aus Flüssigkulturen wurden 1:1000 in PBS-Formalin (2%) verdünnt und der FACS-Analyse zugeführt. Pro Messung wurden 20000-50000 Zellen vermessen und die Daten mit dem Programm WinMDI 2.8 ausgewertet.

2.2.3.11 Infektion von J-774A.1 Zellen mit *Salmonella*

J-774A.1 Zellen wurden in RPMI-H + 10 % iFCS bei 37°C und 5% CO₂ angezogen.

Infektion für die Immunfluoreszenz-Färbung internalisierter Salmonella-Zellen

J-774A.1 Zellen wurden in 24-Trog Platten, mit einem Glasplättchen pro Trog, ausgesät und in RPMI-H kultiviert. Für die Infektion wurden Salmonellen in Mg-Mangelmedium bei 37 °C angezogen und J-774A.1 Zellen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 40:1 (Bakterien:Zelle) infiziert. Um die Aufnahme der Salmonellen zu steigern, wurden die Platten bei 500 x g für 10 min zentrifugiert. Nach 30 min Phagozytose wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und modifiziertes RPMI-H Medium (10% FCS + 20 µg/ml Gentamycin) für 1 h hinzugefügt, um extrazelluläre Bakterien abzutöten. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und eine Immunfluoreszenz-Färbung (siehe 2.2.3.8.2) durchgeführt.

Infektion zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit in Makrophagen und Expression von rekombinanten Proteinen

Salmonellen wurden üN in LB-Selektionsmedium bei 37 °C kultiviert. J-774A.1 Makrophagen wurden mit einer MOI von 20:1 für 1h infiziert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in modifiziertem RPMI-H (10% FCS + 20 µg/ml Gentamycin) für 22 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Es erfolgten drei Waschrunde mit PBS und die Lyse der Makrophagen wurde durch 0,5% Desoxycholat herbeigeführt. Ein Aliquot der Lysate wurden verdünnt und auf LB-Agarplatten plattiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der üN gewachsenen Bakterienkolonien. Das andere Aliquot wurde bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert, um die intakten Salmonellen zu sedimentieren. Die Bakterien wurden in PBS und 2 x SDS Probenpuffer aufgenommen und für 10 min gekocht.

2.2.4 Tierexperimentelle Arbeiten

Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse verwendet, die unter SPF (*specific pathogen free*) Bedingungen gehalten wurden.

2.2.4.1 Transgenes T-Zell-Modell (Bumann, 2001a)

2.2.4.1.1 Transfer von transgenen Splenocyten aus F1 DO11.10xBALB/c in BALB/c Mäuse

8-12 Wochen alte F1 DO11.10 x BALB/c Weibchen wurden mit Halothan betäubt und durch Überstrecken der Halswirbelsäule getötet. Die Milzen wurden steril entnommen, in 10 ml RPMI gegeben und mit dem sterilen Stempel einer 20 ml Spritze zerkleinert. Die Suspension wurde durch ein steriles 70µl Sieb (Falcon) gefiltert und auf 40 ml RPMI aufgefüllt. Nach Zentrifugation (5000 rpm, 5 min, 4 °C) wurde das Zellsediment in 160 mM NH₄Cl (0,7 ml pro Milz) aufgenommen und für exakt zwei Minuten vorsichtig gemischt, um vorhandene Erythrocyten zu lysieren. Die Suspension wurde auf 40 ml mit RPMI aufgefüllt und für 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit 40 ml RPMI gewaschen und in 14 ml PBS (Gibco) aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt, die Zellen erneut zentrifugiert und in PBS zu 100 Mio. Zellen/ml suspendiert.

Weibliche BALB/c Mäuse (8-12 Wochen alt) wurden mit einer Wärmelampe für mindestens 20 min bestrahlt, bis eine deutliche Dilatation der Schwanzvenen erkennbar wurde. Pro Maus wurden 200 µl der Splenocyten-Präparation i.v. in eine der Schwanzvenen injiziert (Durchmesser der Kanüle: 0,3 mm).

2.2.4.1.2 Immunisierung von Mäusen mit *Salmonella*-Stämmen

Einen Tag nach dem T-Zell-Transfer wurden die Mäuse mit Salmonellen Stämmen immunisiert. Dazu wurde frisches Soja-LB Medium mit der jeweiligen Übernachtskultur 1:100 inokuliert und die Kulturen

bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Bei einer $OD_{600} \sim 1,4$ wurden die Zellen geerntet (5000 rpm, 10 min, 4 °C) und in Soja-LB (+ 3%NaHCO₃) zu $5 \times 10^7 - 5 \times 10^{11}$ CFU/ml aufgenommen. 100 µl Dosen wurden den chimären Mäusen mit einer Schlundsonde orogastrisch verabreicht. Die exakten Dosen wurden durch Ausplattieren auf LB Selektionsplatten bestimmt.

2.2.4.1.3 Analyse der Aktivierung transgener T-Zellen in Peyer'schen Plaques und CFU-Bestimmung

Präparation und Färbung

7 Tage p.l. wurden die immunisierten chimären Mäuse getötet und deren Peyer'sche Plaques entnommen. Die Peyer'schen Plaques jeweils einer Maus wurden in 2 ml Eppendorf-Reagenzgefäße, die 2 ml Färbepuffer (PBS + 2%(v/v) iFCS) enthielten transferiert. Anschließend wurden die Peyer'schen Plaques zwischen den aufgerauhten Enden zweier Objektträger vorsichtig zerrieben und die so gewonnene Einzelzellsuspensionen in 2 ml Eppendorf-Reagenzgefäße überführt. 750 µl der Suspensionen wurden in FACS-Röhrchen transferiert und zentrifugiert (1300 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden gefärbt: 50 µl Antikörperpuffer (Färbepuffer + 2%(v/v) inaktiviertes Mausserum), 0,25 µl α -tgTCR clonotyp KJ1-26, 0,5 α -CD4-FITC, 1 µl α -B220-Allophycocyanin, 2 µl α -CD69-Phycoerythrin wurde jedem Ansatz hinzugegeben, vorsichtig gemischt und die Ansätze dunkel für 20 min inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Färbepuffer pro Ansatz wurden die Röhrchen nochmals für 5 min dunkel inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 4°C, 1300 rpm). Jeder Ansatz wurde mit Streptavidin-FarRed (0,5 µl in 50 µl Antikörperpuffer) für 5 min im Dunklen gefärbt die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Färbepuffer beendet. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min, 4 °C, 1300 rpm), in 80 µl PBS suspendiert, gemischt und durch Zugabe von 80 µl 2% Formalin-PBS fixiert. Bis zur Messung wurden die Zellen nun dunkel bei 4 °C gelagert.

Bestimmung der Lymphocytenmenge

Von jeder Einzelzellsuspension wurde die Anzahl der Lymphocyten bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot verdünnt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer analysiert.

CFU-Bestimmung

Je 200 µl der Einzelzellsuspensionen wurde mit 700 µl PBS und 100 µl 1%TritonX-100 (in PBS) versetzt und 10 sec kräftig gemischt (Vortex). Danach wurden Verdünnungen hergestellt und auf LB-Selektionsplatten ausplattiert. Um die Plasmidstabilität *in vivo* zu bestimmen, wurden die Verdünnungen parallel auf Platten ohne Ampicillin ausplattiert.

Durchflußzytometrie

Die gefärbten Einzelzellsuspensionen wurden in einem Calibur Durchflußzytometer (Becton Dickinson) untersucht. Durch Setzen von Auswahlregionen, wurden CD4⁺tgTCR⁺B220⁻ Lymphocyten hinsichtlich ihrer CD69 Expression und ihrem „vorwärts“-Streuverhalten analysiert. Durch Einbeziehen der Gesamtlymphocytenzahl, dem Anteil der tgT-Zellen und dem Prozentsatz der blastenbildenen tgT-Zellen konnte die Anzahl aller aktivierten tgT-Zellen in den Peyer'schen Plaques einer Maus quantitativ bestimmt werden.

2.2.4.2 Kolonisierung der Peyer'schen Plaques durch *Salmonella* und bakterielle GFP-OVA Expression

BALB/c Mäuse (8-12 Wochen alt) wurden mit *Salmonella*-Vakzinstämmen infiziert (siehe Kapitel 2.2.4.1.2) und nach unterschiedlichen Zeitintervallen p.l. getötet. Die Peyer'schen Plaques wurden wie in 2.2.4.1.3 isoliert und nach Behandlung mit 0,1% Triton X-100 wurden Verdünnungen ausplattiert. Wurde mit GFP_OVA exprimierenden Stämmen immunisiert, konnte die Expression in situ gemessen werden. Dazu wurden mit 0,1% Triton X-100 behandelte Zellsuspensionen mit Formalin fixiert (2% Endkonzentration) und in einem FacsScan Durchflußzytometer auf ihre grüne (FL-1:514-545 nm) und orange (FL-2: 563-607 nm) Fluoreszenz analysiert. GFP-OVA ausprägende *Salmonella*-Zellen konnten aufgrund ihrer typischen Emmissions-Verhältnisse (FL-2/FI-1), die um eine Größenordnung kleiner als die des autofluoreszierenden Gewebes sind, identifiziert werden.

2.2.4.3 *H. pylori* Protektionsversuche

2.2.4.3.1 Immunisierungsexperimente

Vor der Immunisierung wurden BALB/c Mäuse (6-8 Wochen alt) üN die Nahrung entzogen. Gefrorene Aliquots von *Salmonella* Impfstämmen wurden auf Eis aufgetaut, mit einer Soja-LB/Glycerin Mischung (70%/30%, v/v) zu 1×10^{10} CFU/ml versetzt und nochmals 1:2 mit einer 100 mM NaHCO₃-Lösung verdünnt. 200 µl der Zellsuspension (entspricht einer Dosis von 1×10^9 CFU) wurden pro Maus mit einer Schlundsonde orogastrisch verabreicht. Für Kolonisierungsstudien von Salmonellen Stämmen in vivo, wurden immunisierte Mäuse sieben Tage p.l. getötet, die Peyer'schen Plaques entnommen, Einzellzellsuspensionen hergestellt, mit 0,1% TritonX-100 behandelt und Verdünnungen davon ausplattiert.

2.2.4.3.2 Belastungsinfektion mit *H. pylori*

Vier Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit *H. pylori* infiziert. Eine Sekundär-Flüssigkultur in BHI-Komplettmedium von *H. pylori* P76 wurde in BHI auf eine OD₆₀₀ von 5 eingestellt, was ca. $2,5 \times 10^9$ Bakterien/ml entspricht. Zur Kontrolle wurden die Lebendzellzahl und die Abwesenheit von Kontaminationen durch Plattierung bestimmt. Mittels einer Schlundsonde wurden den Mäusen oral unter keimarmen Bedingungen 100 µl einer 3% NaHCO₃-Lösung appliziert, um den pH-Wert des Magens zu neutralisieren. Anschließend wurde mittels der Schlundsonde 100 µl der *H. pylori*-Suspension verabreicht.

2.2.4.3.3 Bestimmung der Besiedlung von Mäusen mit *H. pylori*

Drei Wochen nach der Belastungsinfektion wurden die Tiere mit Halothan betäubt, durch Überstrecken der Halswirbel getötet und unter sterilen Bedingungen der Bauchraum eröffnet und der

Magen präpariert. Der Magen wurde dann entlang seiner kleinen Krümmung geschnitten und der Mageninhalt mit einem Skalpell vorsichtig abgekratzt. Eine Hälfte des Magens wurde in 1 ml BHI-Medium gegeben und mit einem UltraThorax Homogenisator homogenisiert bis das Magengewebe vollständig zerstört war. Die *H. pylori*-Lebendzellzahl wurde bestimmt, indem Verdünnungen der Magen-Suspension auf *H. pylori*-Agarplatten mit 400 µg/ml Streptomycin plattiert wurde, so dass nur die Streptomycin resistenten *H. pylori* P76-Zellen Kolonien bilden konnten.

2.2.4.4 GFP-OVA Abbau in rekombinanten *Salmonella*-Stämmen

Zur Bestimmung GFP-OVA Abbaus in rekombinanten *Salmonella*-Stämmen, wurde Chloramphenicol zu Salmonellen Zellsuspensionen (170 µg/ml) hinzugefügt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen, in 2% Formalin (Endkonzentration) fixiert und in einem FacsScan Durchflußzytometer auf ihre grüne (FL-1:514-545 nm) und orange (FL-2: 563-607 nm) Fluoreszenz analysiert.

In vitro kultivierte *Salmonella*-Stämme

Bakterien wurden in Soja-LB angezogen und in unterschiedlichen Wachstumsphasen (stationär oder logarithmisch) wurde Chloramphenicol zugesetzt und der GFP-OVA Abbau bestimmt.

In vivo

a) Milz

Eine Salmonellen Kultur in logarithmischer Phase wurde geerntet und in PBS zu einer $OD_{575} = 0,01$ in PBS (Gibco) aufgenommen. BALB/c Mäusen (8-12 Wochen) wurde eine Dosis von 1×10^6 CFU i.v. in eine der Schwanzvenen injiziert und die Tiere am nächsten Morgen getötet. Die Milz wurde steril entnommen und in 1 ml vorgewärmten 0,1% TritonX-100 aufgenommen, mit einem Stempel einer 20 ml Spritze homogenisiert und 10 sec stark gemischt (Vortex). Nach Zugabe von 4 ml Soja-LB und Chloramphenicol (170 µg/ml) wurde die Suspension in 0,25 ml Aliquots aufgeteilt und bei 37 °C schüttelnd inkubiert (200 rpm). Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden Proben entnommen, mit Formalin fixiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

b) Caecum

Mäusen wurde zwei Tage vor Infektion normales Trinkwasser entzogen und durch Streptomycin (2 mg/l) versetztes und sterilfiltriertes Leitungswasser ersetzt. Salmonellen wurden üN auf LB-Platten bei 37 °C angezogen und die Platte geerntet. Nach Waschen mit Soja-LB (+3% NaHCO₃) wurden die Zellen in Soja-LB (+3% NaHCO₃) zu einer $OD_{600}=50$ aufgenommen und Mäusen orogastrisch mit einer Schlundsonde 100 µl der Suspension verabreicht. Am nächsten Morgen wurden die Mäuse getötet, der Bauchraum steril geöffnet und das Caecum entnommen. Nach Homogenisieren mit 1 ml PBS-0,1% TritonX100 und starken Mischen (Vortex) wurde mit Soja-LB auf 5 ml aufgefüllt und Chloramphenicol (170 µg/ml) dazugegeben. Die Suspension wurde in 0,25 ml Aliquots aufgeteilt und bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Proben wurden nach verschiedenen Zeitintervallen entnommen, mit Formalin fixiert und bis zur Analyse durch das Durchflußzytometer auf Eis gelagert.

3. Experimente und Ergebnisse

3.1 Darstellung eines Ovalbumin-Epitops in verschiedenen zellulären Kompartimenten von *Salmonella* und Optimierung der Kolonisierung rekombinanter Impfstämme

Verschiedene Studien haben sich mit der Induktion humoraler Immunantworten durch rekombinante *Salmonella*-Stämme befaßt, während die Auslösung zellulärer Immunantworten, die für die Bekämpfung pathogener Mikroorganismen essentiell ist (Schaible *et al.*, 1999), nur selten untersucht wurde. Die Anwendung eines transgenen T-Zell-Rezeptor (tgTCR) Mausmodells ermöglichte die Analyse der Induktion der frühen T-Zellantwort durch rekombinante *Salmonella*-Stämme (Bumann, 2001a). In diesem Modell wurden T-Zellen, die mit Hilfe eines transgenen T-Zell-Rezeptors einen Komplex aus MHCII-Molekülen und einem Ovalbuminepitop erkennen, in naive Mäuse adoptiv transferiert. Diese chimären Mäuse werden anschließend mit rekombinanten *Salmonella*-Stämmen, die das Ovalbuminepitop (OVA) synthetisieren, immunisiert. Die transgenen T-Zellen lassen sich mit Hilfe eines clonotypischen Antikörpers identifizieren und das Ausmaß ihrer Aktivierung durch Analyse der CD69-Produktion und der Blastenbildung bestimmen (Bumann, 2001a).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Auswirkung der Antigenlokalisierung auf die Immunogenität rekombinanter *Salmonella*-Stämme im transgenen T-Zell-Modell detailliert untersucht werden. Als Trägerproteine wurden der AIDA-I Autotransporter, das Braun'sche Lipoprotein Lpp, das Galaktose-Bindeprotein MglB und das Green-Fluorescent-Protein GFP verwendet, die eine Lokalisierung auf der Zelloberfläche, auf der Innenseite der äußeren Membran, im Periplasma oder im Cytoplasma vermitteln. In diesem Kapitel werden die Konstruktion, Charakterisierung und Optimierung OVA-ausprägender *Salmonella*-Stämme beschrieben.

3.1.1 Präsentation des OVA-Epitops auf der Zelloberfläche attenuierter *Salmonella*-Stämme durch den AIDA-I Autotransporter

Der Pathogenitätsfaktor IgAase aus *Neisseria gonorrhoeae* gilt als der erste entdeckte Autotransporter (Pohlner *et al.*, 1987b). Seitdem wurde eine Vielzahl weiterer Autotransporter in Gram negativen Bakterien gefunden (Henderson und Nataro, 2001). All diesen Proteinen ist gemeinsam, dass sie als Precursorprotein synthetisiert werden und nach Abspaltung der Signalpeptidsequenz in das Periplasma durch den Sec-pathway

transportiert werden. Von dort aus lagert sich das C-terminale β -Faß in die äußere Membran und ermöglicht die Translokation der N-terminalen Passagierdomäne zur Zelloberfläche ohne Hilfe weiterer akzessorischer Proteinkomponenten (Jose *et al.*, 1995; Pohlner *et al.*, 1987b). Zur Präsentation heterologer Proteine in *Salmonella* bietet sich der AIDA-I (*adhesin involved in diffuse adherence*) Autotransporter (Benz und Schmidt, 1989) an, da die zur Translokation benötigte Domäne eingehend charakterisiert wurde und Fusionsproteine in *E. coli* in hohen Mengen synthetisiert werden konnten (Maurer *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1999).

3.1.1.1 Konstruktion einer *ova-ha-ctB-aida-i* Fusion

Die Regulation der Antigensynthese in *Salmonella*-Vakzinstämmen, kann dramatische Auswirkungen auf die Kolonisierungsfähigkeit der Stämme *in vivo* haben (Bumann, 2001b). Deshalb wurden verschiedene Promotoren ausgewählt, die die Synthese des AIDA-I Fusionsproteins steuern: der konstitutiv aktive P_{TK} Promotor (Klauser *et al.*, 1990) und die während einer Infektion induzierten Promotoren P_{phoP} und P_{pagC} aus *Salmonella* (Dunstan *et al.*, 1999; Hohmann *et al.*, 1995).

Ausgangspunkt der Klonierungen war das Plasmid pLAT260 (Kramer *et al.*, 2003a), das für ein Fusionsprotein aus dem HA-Epitop des Hämagglutinins des Influenzavirus, einer modifizierten Cholera toxin B-Untereinheit ohne Cysteine (CTB) (Maurer *et al.*, 1997) und der Autotransporter-Domäne von AIDA-I (Maurer *et al.*, 1997) codiert. Mit dem Plasmid pLAT260 als Matrize wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden A3 und KRI3 durchgeführt. Das entstandene Amplikon diente als Matrize für eine weitere PCR mit den Oligonukleotiden EF16/LAT63. KRI3 und LAT63 codierten zusätzlich für 25 Aminosäuren des Ovalbumins, ESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVG, die ein dominantes H-2^d 17mer T-Zell-Epitop und je 4 Aminosäuren am N- und C-Terminus enthalten.

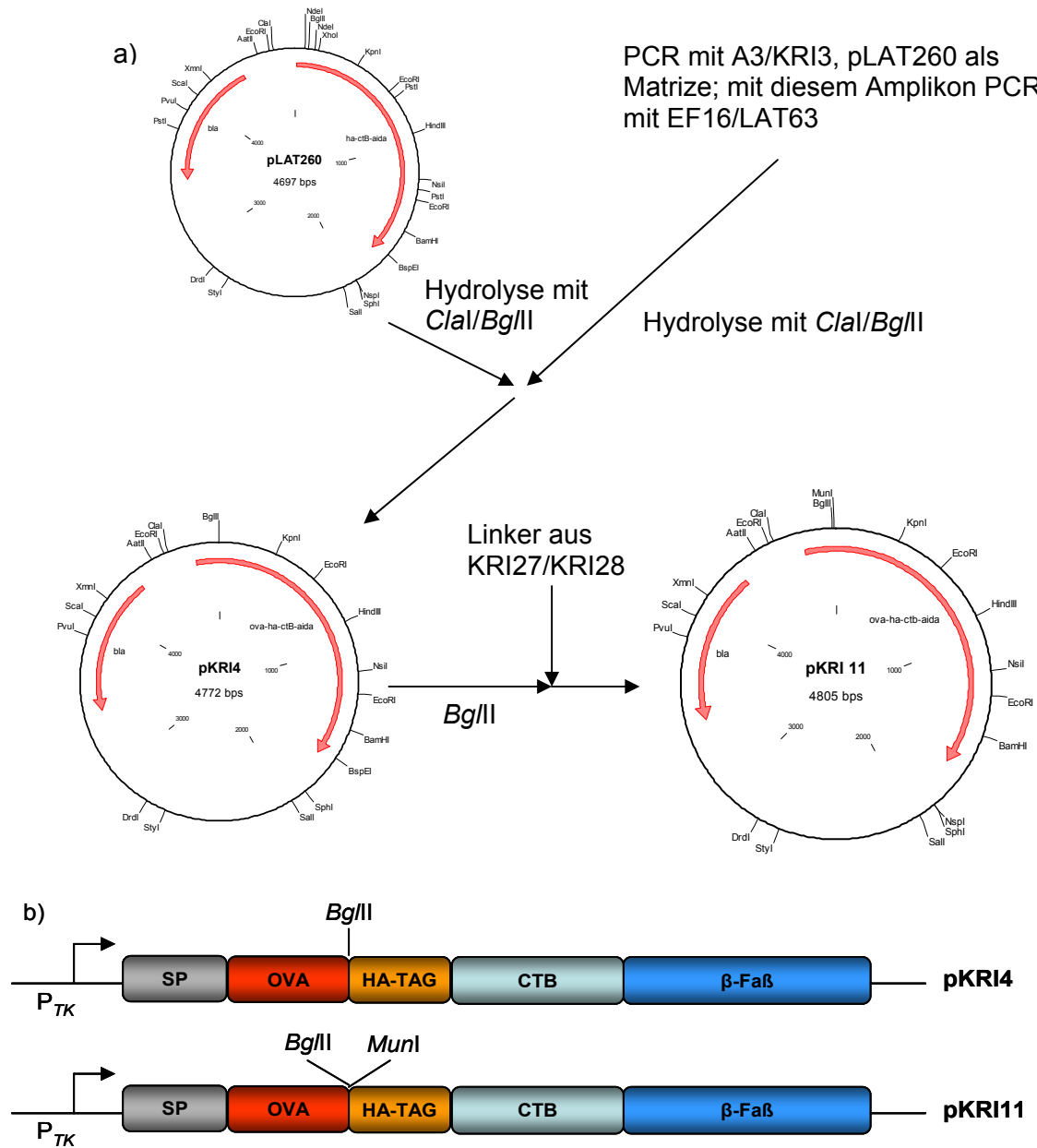


Abb. 2: Schematische Darstellung der Konstruktion von pKRI4 und pKRI11. Klonierungsstrategie, Einzelheiten im Text (a). β -Fa β : AIDA-I Autotransporter Translokationseinheit; CTB: modifiziertes Cholera-toxin B; HA-Tag: B-Zell-Epitop des Hämagglutinin aus dem humanen Influenzavirus; OVA: Aminosäuren 319-343 des Ovalbumins; SP: Signalpeptid aus Cholera-toxin B

Das zweite PCR-Produkt wurde mit *Clal* und *BglII* hydrolysiert und in den mit *Clal/BglII* vorbehandelten Vektor pLAT260 inseriert. Das resultierende Plasmid pKRI4 (Abb. 2), das für OVA-HA-CTB-AIDA-I codiert, wurde mit *BglII* geschnitten und ein DNA-Fragment, entstanden aus der Hybridisierung der Oligonukleotide KRI27 und KRI28, wurde eingefügt.

Das so generierte Plasmid pKRI11 (Abb. 2) besitzt eine zusätzliche *MunI*-Erkennungssequenz direkt stromabwärts der *BglII* Sequenz. Für *in vivo* Experimente wurde die *aida-i* Fusion aus pKRI11 subkloniert, um Plasmide zu erzeugen, bei denen die Expression der AIDA-I Fusion durch die Promotoren P_{TK} , P_{phoP} und P_{pagC} reguliert wird und noch zusätzlich ein *thyA*-Allel enthalten (Abb. 3). Um das Plasmid pKRI24 zu erhalten, wurde ein *ova-ha-ctB-aida* DNA-Fragment aus pKRI11 mittels PCR mit dem Oligonukleotidpaar KRI45/KRI46 amplifiziert, mit *Sall* hydrolysiert und in den mit *Sall* geschnittenen Vektor pLAT389 transferiert. Alternativ wurde das *aida-i* Fusionsgen mit den Oligonukleotiden KRI38/KRI39 amplifiziert, mit *XbaI/NcoI* verdaut und in den ebenso hydrolysierten Vektor pKRI35 (siehe Kapitel 3.3.2.1) inseriert und so das Plasmid pKRI41 generiert. Um die Produktion des OVA-HA-CTB-AIDA-I Fusionsproteins durch den *pagC*-Promotor zu regulieren, wurde *phoP*-Promotor aus pKRI41 durch *XbaI*-Verdau und anschließenden Partialverdau mit *Sall* entfernt. Der *pagC* Promotor wurde aus chromosomaler DNA von CREA0293 mittels PCR mit den Oligonukleotiden LAT142/LAT143 amplifiziert, mit *XbaI* und *XhoI* verdaut und in das wie beschrieben hydrolysierte Plasmid pKRI41 inseriert. Das so entstandene Plasmid pKRI65 enthielt somit anstelle des *phoP* den *pagC* Promotor. Eine Übersicht der Plasmide, die verschiedene Promotoren enthalten, ist in Tabelle 2 abgebildet.

Tab. 2: Übersicht über die verschiedenen Plasmide, auf denen OVA-HA-CTB-AIDA-I codiert ist und dessen Synthese durch verschiedene Promotoren reguliert wird

Plasmid	Promotor
pKRI24	P_{TK}
pKRI41	P_{phoP}
pKRI65	P_{pagC}

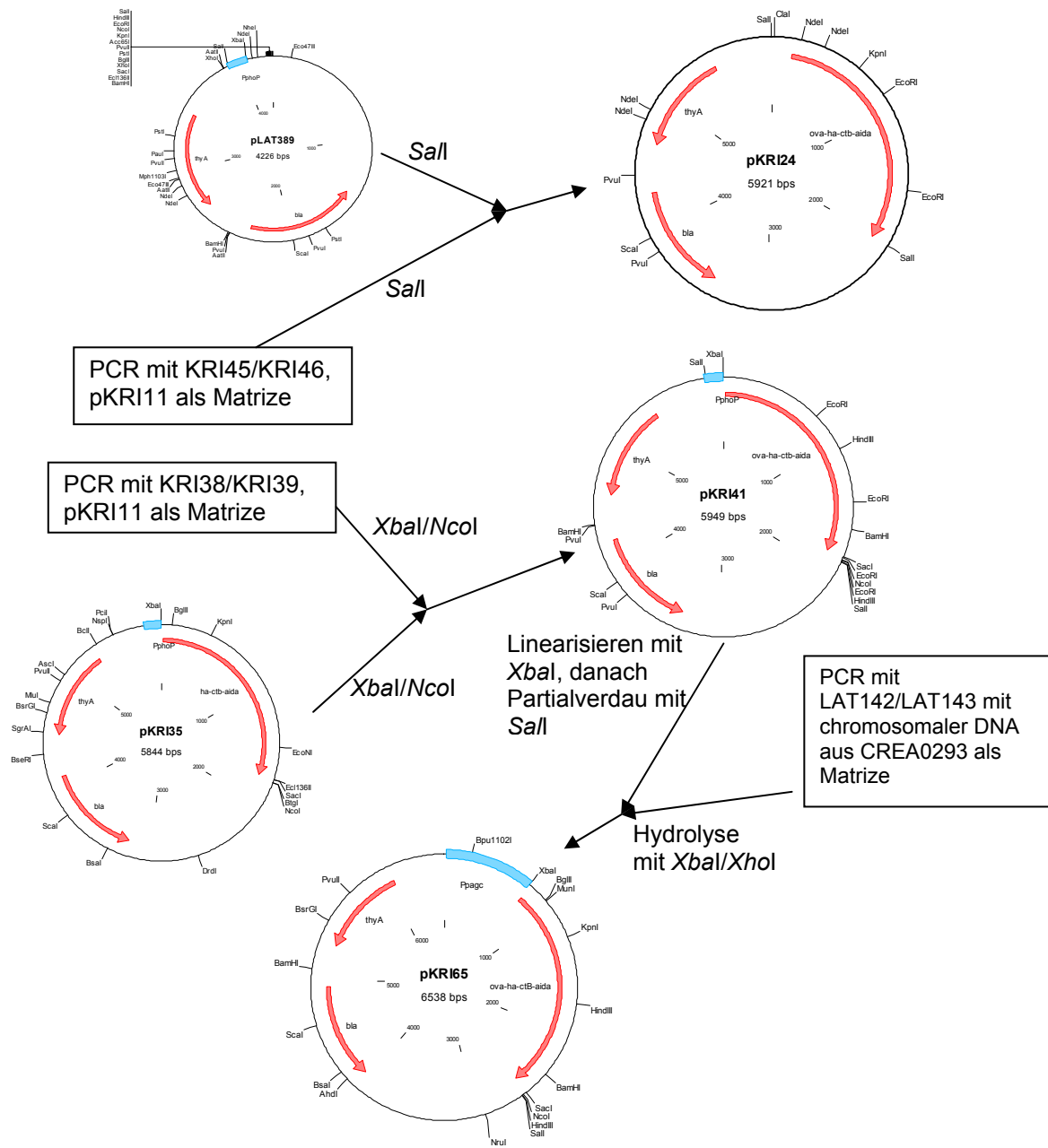


Abb. 3: Klonierungsstrategie für die Plasmide pKRI24, 41 und 65. Einzelheiten im Text.

3.1.1.2 Das OVA-HA-CTB-AIDA-I Fusionsprotein wird auf der Zelloberfläche von attenuierten *Salmonella*-Stämmen präsentiert

Der attenuierte *Salmonella*-Stamm CREA1283 wurde mit dem Plasmid pKRI24 transformiert. Zellen wurden auf LB-Agarplatten angezüchtet. Die Zellen wurden lysiert und nach Präparation der äußeren Membran und anschließender SDS-PAGE konnte das Fusionsprotein mittels Coomassie Blue G-250-Färbung des Gels und im Western-Blot mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop detektiert werden (Abb. 4).

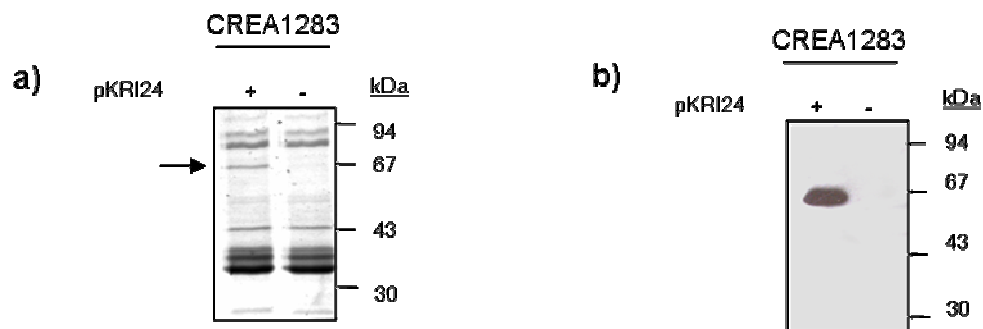


Abb. 4: Nachweis von OVA-HA-CTB-AIDA-I in der äußeren Membran von CREA1283. Zellen wurden auf LB-Platten angezogen, deren äußere Membran präpariert und einer SDS-PAGE unterzogen. A) Coomassie Blue G-250-gefärbtes PAA-Gel. B) Immunoblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop.

Zur Überprüfung der Oberflächenexposition von Fusionsproteinen auf der Oberfläche dient die Behandlung intakter Zellen mit exogen zugegebenen Proteasen wie Trypsin. Dadurch werden selektiv oberflächenexponierte Proteindomänen hydrolysiert, während cytoplasmatische oder periplasmatische Proteine nicht gespalten werden (Lattemann *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 1999). Zudem werden auch Proteine, die in der äußeren Membran eingebettet sind und keine Protease-sensitiven Strukturen exponieren, durch diese Behandlung nicht prozessiert. Diese Methode erlaubt es also festzustellen, ob die Passagierdomäne eines Autotransporters zur Zelloberfläche transloziert wird. Die Oberflächenpräsentation des OVA-Peptids auf der Zelloberfläche wurde durch Trypsinierung intakter CREA1283(pKRI24) Zellen untersucht. In Zellysaten trypsinierter Zellen konnte das Fusionsprotein weder durch Coomassie Blue G-250 -Färbung noch durch Immunoblot mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop nachgewiesen werden (Abb. 5).

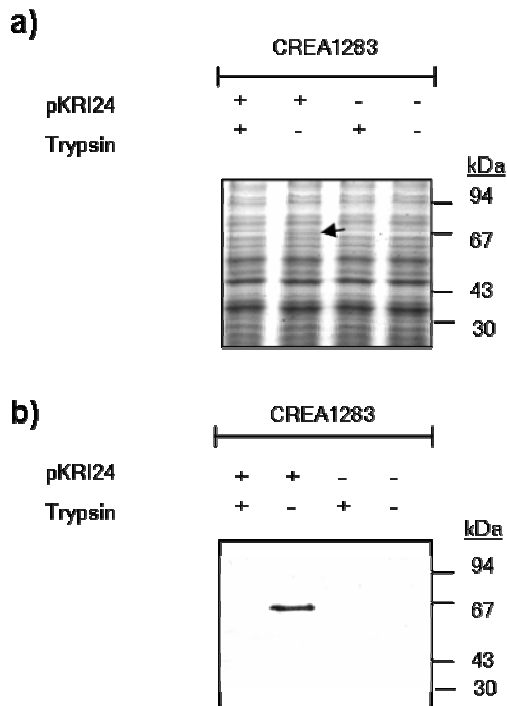


Abb. 5: Protease-Zugänglichkeit des OVA-HA-CTB-AIDA-I Fusionsproteins im *Salmonella*-Stamm CREA1283. *Salmonella*-Stämme wurden auf LB-Platten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und mit Trypsin oder PBS behandelt. Ganzzelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit Coomassie Blue G-250 gefärbt (a) oder einer Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop unterzogen (b).

Zusätzlich wurde die Oberflächenpräsenz durch indirekte Immunfluoreszenz belegt. Der HA-spezifische monoklonale Antikörper band an CREA1283(pKRI24) Zellen, die OVA-HA-CTB-AIDA-I bildeten, während der plasmidlose Parentalstamm CRE1283 nicht angefärbt wurde (Abb. 6).

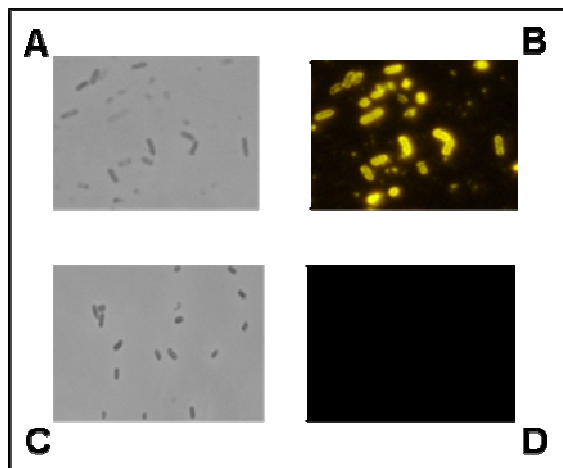


Abb. 6: Oberflächenpräsenz von OVA-HA-CTB-AIDA-I im *S. enterica* serovar *Typhimurium* Impfstamm CREA1383(pKRI24). Indirekte Immunfluoreszenz der *Salmonella*-Stämme CREA1283(pKRI24) (A und B) und CREA1283 (C und D). Physiologisch intakte Zellen wurden mit einem monoklonalem Antikörper gegen das HA-Epitop und mit einem Cy3-konjugierten Ziege anti-Maus sekundären Antikörper gefärbt. Die gefärbten Bakterien wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (B und D) oder Durchlichtmikroskopie (A und C) untersucht.

3.1.1.3 Regulierte Synthese des OVA-HA-CTB-AIDA-I Fusionsproteins beeinflusst die Kolonisierungsfähigkeit attenuierter *Salmonella*-Impfstämme

Die Induktion einer CD4⁺-T-Antwort durch Lebendvakzinstämme ist abhängig von deren Kolonisierungsfähigkeit *in vivo* (Bumann, 2001b). Deshalb war es essentiell zu bestimmen, welcher der hier verwendeten Promotoren die "fitness" rekombinanter Bakterien *in vivo* am wenigsten einschränkt. Die in Tabelle 2 aufgeführten Plasmide wurden deshalb in CREA1283 etabliert und Bakterien aus der spät-logarithmischen Phase zu 1×10^{11} CFU/ml in Soja-LB (+ 3% NaHCO₃ (w/v)) aufgenommen. Dosen von 1×10^{10} CFU wurden BALB/c Mäusen orogastrisch verabreicht und nach 7 Tagen wurde die Kolonisierung in den Peyer'schen Plaques bestimmt (Abb. 7a). Zusätzlich wurde die Produktion des AIDA-I Fusionsproteins in den verschiedenen Stämmen während der spät logarithmischen Wachstumsphase analysiert (Abb. 7b).

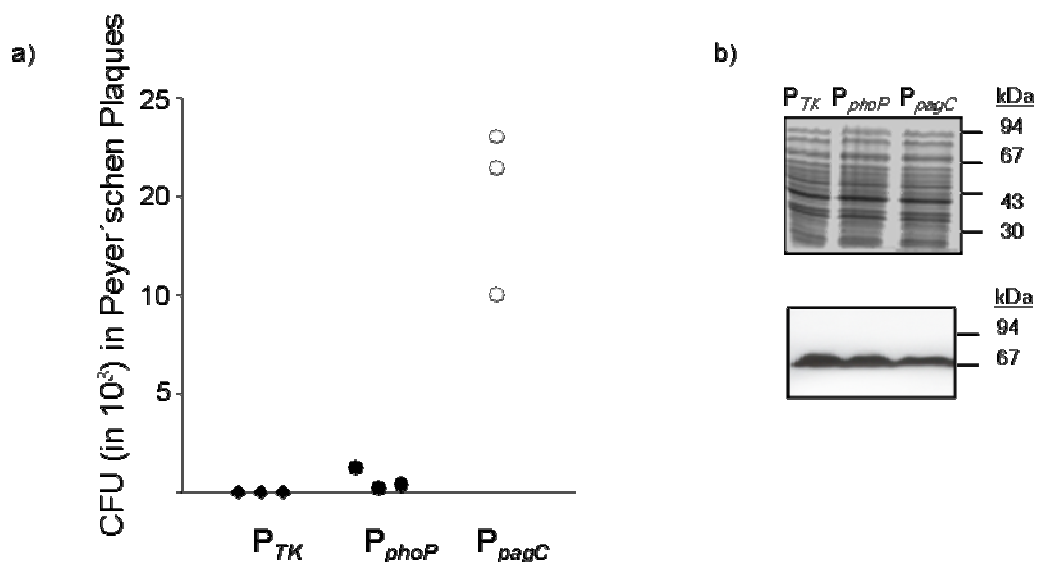


Abb. 7: Kolonisierung von Mäusen durch OVA-CTB-AIDA-I synthetisierende CREA1283-Stämme. (a) Je drei BALB/c Mäuse wurden mit 1×10^{10} CFU der rekombinanten *Salmonella*-Stämme immunisiert. Nach 7 Tagen wurden die Mäuse getötet, die Peyer'schen Plaques entnommen, homogenisiert und auf LB-Selektionsplatten ausplattiert. (b) Die Synthese des AIDA-I Fusionsproteins in den verschiedenen Stämmen während der spät-logarithmischen Wachstumsphase wurde durch SDS-PAGE (oben) oder Immunoblot mit einem HA-Epitop spezifischen Antikörper (unten) analysiert.

Wie deutlich aus Abbildung 7a ersichtlich ist, führt eine regulierte Synthese durch den P_{pagC}-Promotor zu einer verbesserten Kolonisierung der rekombinanten *Salmonella*-Stämme ($14,8 \pm 0,3 \times 10^3$ CFU; Mittelwert) im Vergleich zum P_{phoP}-Promotor ($6 \pm 0,2 \times 10^2$ CFU, Mittelwert). Der *Salmonella*-Stamm CREA1283(pKRI24), in dem die Synthese des Fusionsproteins durch den konstitutiven P_{TK}-Promotor reguliert wurde, war nicht in der Lage *in vivo* zu

kolonisieren. Plasmidtragende Zellen dieses Stammes waren in den Peyer'schen Plaques nicht nachweisbar. Das Kolonisierungsvermögen spiegelt sich auch in der Plasmidstabilität *in vivo* wider. Zur Bestimmung der Plasmid-Stabilität *in vivo* wurden die Homogenate der Peyer'schen Plaques auf LB-Strep₉₀ und parallel auf LB-Strep₉₀-Amp₁₀₀ ausplattiert und die CFU ermittelt. Die höchste Plasmidstabilität wurde durch den P_{pagC}-Promotor erzielt (ca. 85% plasmidtragende Zellen), gefolgt vom P_{phoP}-Promotor mit ca. 4% und dem P_{TK}-Promotor mit 0%. Um die Frage zu klären, wie stark die *in vivo* Promotoren P_{pagC} und P_{phoP} *in vivo* induziert werden, wurden GFP-OVA Vergleichskonstrukte hergestellt (Abb. 8), da die GFP-OVA Synthese *in vivo* durch Durchflußzytometrie gemessen werden kann (Bumann, 2002).

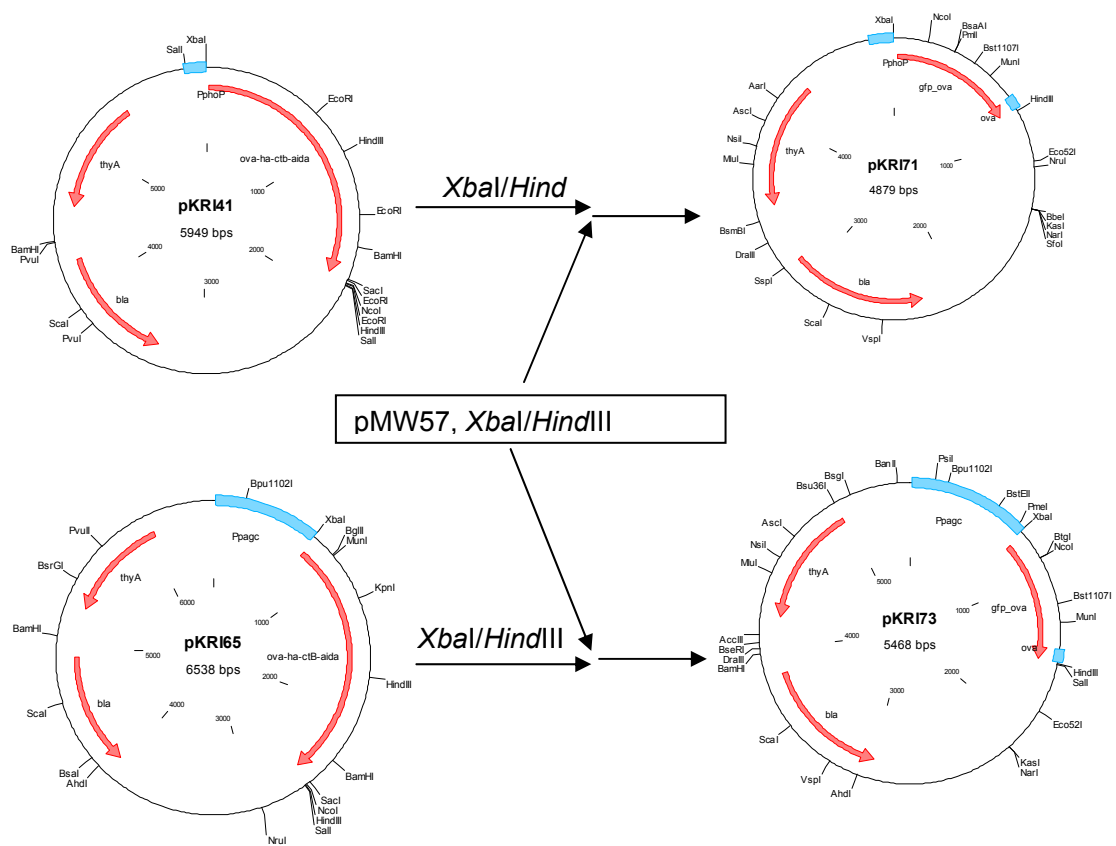


Abb. 8: Konstruktion von GFP-OVA Expressionsvektoren. Das GFP-OVA codierende Plasmid pMW57 (Dr. D. Bumann, persönliche Mitteilung) wurde mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *HindIII* behandelt und ein promotorloses *gfp-ova* DNA-Fragment in die ebenfalls mit *XbaI/HindIII* hydrolisierten Plasmide pKR141 und pKR165 transferiert. Dadurch wurde jeweils ein *ova-ha-ctb-aida-i* Fragment gegen ein *gfp-ova* Fragment ausgetauscht und die Plasmide pKR171 und pKR173 generiert.

Die hergestellten Plasmide pKRI71 (Regulation der GFP-OVA-Synthese durch den P_{phoP} -Promotor) und pKRI73 (Regulation der GFP-OVA-Synthese durch den P_{pagC} -Promotor) wurden in CREA1283 transformiert. Die Stämme wurden in Soja-LB angezogen und die *in vitro* Synthese wurde in spät-logarithmischen Kulturen durch Durchflußzytometrie bestimmt (Tab. 3). Für die Analyse des Syntheseniveaus *in vivo* wurden je zwei Mäuse mit 1×10^{10} CFU infiziert, nach 5 Tagen getötet, und die GFP-OVA Menge in intakten *Salmonella*-Zellen, die die Peyer'schen Plaques besiedelten mit einem Durchflußzytometer gemessen (Tab. 3).

Tab. 3: GFP-OVA Fluoreszenz *in vitro* und *in vivo*. Die Expression von GFP-OVA im *Salmonella* Stamm CREA1283 unter *in vitro* Bedingungen (spät-logarithmische Phase in LB-Soja) oder in Peyer'schen Plaques (5 Tage pi mit 1×10^{10} CFU) wurde durch FACS-Analyse bestimmt. Angegeben ist der Median der GFP-Fluoreszenz intakter Bakterien. ^a Je zwei Mäuse wurden verwendet.

Promotor	GFP-OVA Menge <i>in vitro</i> (Median)	GFP-OVA Menge in Peyer'schen Plaques (Median) ^a
P_{phoP}	~ 200	~ 1000
P_{pagC}	~ 4 (Nachweisgrenze)	~ 100

Regulierte Expression durch den P_{phoP} -Promotor brachte ein hohes Basalniveau und ein ca. 5-fache Induktion *in vivo*. Hingegen wurde durch den P_{pagC} -Promotor nur sehr wenig *in vitro* produziert und es erfolgte eine ca. 50-fache Induktion *in vivo*. Es bleibt auch festzuhalten, dass der P_{phoP} -Promotor *in vivo* zu einer 10-mal stärkeren Bildung von GFP-OVA führt als der P_{pagC} -Promotor.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass sich eine hohe Synthese des OVA-HA-CTB-AIDA-I-Fusionsproteins negativ auf die Kolonisierungsfähigkeit von attenuierten *Salmonella*-Stämmen auswirkt. Andere heterologe Proteine, wie z.B. GFP-OVA, sind auch in sehr hohen Mengen für *Salmonella* gut tolerierbar und führen zu keiner Verschlechterung der Kolonisierung (Wendland und Bumann, 2002). Die Verwendung des P_{pagC} -Promotors für das AIDA-I Expressionssystem schwächte die "fitness" von *Salmonella* noch am wenigsten ab.

3.1.1.4 Modulation der Proteinsynthese durch verschiedene Shine-Dalgarno-Sequenzen und Einfluss auf die Kolonisierung

Eine weitere Möglichkeit die Proteinmenge in Bakterien zu regulieren, besteht in der Veränderung der Shine-Dalgarno-Sequenz (oder Ribosomen-Bindestelle, RBS) (Yarchuk *et al.*, 1992). Definierte Mutationen (Dr. Dirk Bumann, persönliche Mitteilung) wurden in die

RBS der *ova-ha-ctB-aida-i* Fusion durch PCR eingefügt und deren Auswirkung auf das Syntheseniveau und Kolonisierung der rekombinanten *Salmonella*-Stämme überprüft.

Im Einzelnen wurden PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden KOR_RBS_x (x=3, 4 oder 6)/LAT215 und pKRI65 als Matrize durchgeführt. Die generierten Amplikons enthielten ein DNA-Fragment bestehend aus der mutierten RBS, der Signalpeptidsequenz und *ova-ha-ctB*. Die Amplikons wurden mit *Xba*I und *Kpn*I verdaut und in den ebenso hydrolysierten Vektor pKRI65 transferiert. Tabelle 4 enthält eine Beschreibung der generierten Plasmide.

Tab. 4: Plasmide mit veränderter RBS. ^a Abweichungen von der optimalen Sequenz AGGAG sind unterstrichen. ^b Die Sequenz für die mutierte RBS liegt im 5'-Bereich der angegebenen Oligonukleotide. Die Synthese von OVA-HA-CTB-AIDA-I ist durch den P_{pagC} Promotor reguliert.

Plasmid	RBS-Sequenz ^a	Oligonukleotid ^b
pKRI171	RBS3: A <u>A</u> GAG	KOR_RBS3
pKRI172	RBS2: AG <u>C</u> AG	KOR_RBS4
pKRI175	RBS1: A <u>A</u> G <u>A</u>	KOR_RBS6

Die Plasmide pKRI171, 172 und 175 wurden in den *Salmonella*-Stamm CREA1283 transformiert und die Synthese unter für den P_{pagC}-Promotor induzierenden Bedingungen analysiert. Die Zellen wurden dazu in modifizierten M9-Medium unter Magnesiummangelbedingungen (10µM MgSO₄) angezogen und dann 1:100 in frisches Medium überimpft und für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Zell-Lysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit einem Ovalbumin-Antikörper analysiert (Abb. 9).

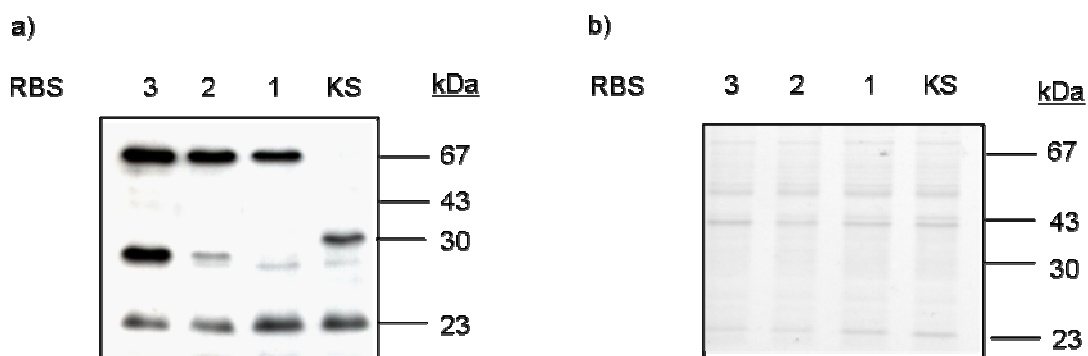


Abb. 9: Modulation der Synthese des AIDA-I Fusionsproteins im *Salmonella*-Stamm CREA1283 durch unterschiedliche Ribosomale Bindestellen. Rekombinante *Salmonella*-Stämme wurden in M9 Medium (10µg MgSO₄) inkubiert, am nächsten Tag frisches Medium 1:100 inokuliert. Nach 3 h wurden die Zellen geerntet und Lysate hergestellt. (a) Immunoblot mit einem α-OVA Antiserum. (b) Coomassie Blue G-250 gefärbtes PAA-Gel. KS: Kontrollstamm, der GFP-OVA synthetisiert (pKRI177, siehe 3.2.1.1)

Die gewählten *in vitro* Bedingungen induzierten die Synthese bis zu 10% der in Peyer'schen Plaques gebildeten Proteinmenge (parallele Messung der GFP-OVA Menge in einem in M9-Medium kultivierten Vergleichsstamm, Daten nicht gezeigt). Eine Abstufung der Proteinmenge war deutlich zu erkennen, wobei RBS 3 die stärkste und RBS 1 die schwächste Expression bedingt. Um den Effekt der modulierten Expression *in vivo* zu testen, wurden je 2 bzw. 3 BALB/c Mäuse mit 10^{10} CFU der rekombinanten *Salmonella*-Vakzinstämme orogastrisch immunisiert. Nach 7 Tagen wurde die Kolonisierung in den Peyer'schen Plaques bestimmt (Abb. 10). Die stärkste Produktion (RBS3) führte zur schlechtesten Kolonisierung ($0-10^2$ CFU) und umgekehrt. RBS1 und RBS2 ermöglichten eine Kolonisierung im Bereich von 10^4 und 10^5 CFU. Die Plasmidstabilität für pKRI175 betrug etwa 95% und für pKRI172 ca. 75-85 %.

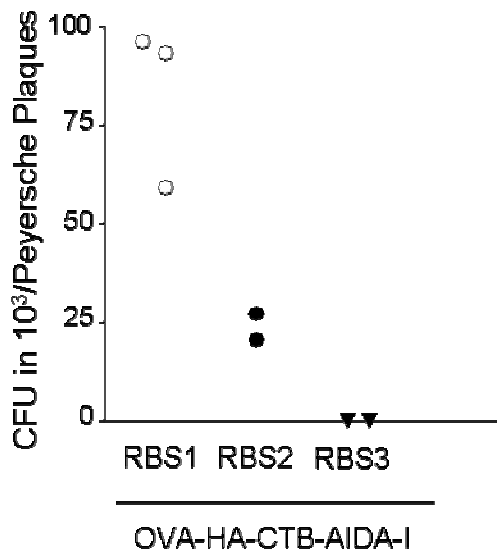


Abb. 10: Modulation der Antigensynthese durch verschiedene RBS-Varianten beeinflusst die Kolonisierungsfähigkeit rekombinanter *Salmonella*-Stämme. Je 2 oder 3 BALB/c Mäuse wurden mit 10^{10} CFU OVA-HA-CTB-AIDA-I bildender *Salmonella*-Stämme immunisiert. Nach 7 Tagen pi wurden die Mäuse getötet und die CFU in den Peyer'schen Plaques durch Ausplattieren auf LB-Strep₉₀-Amp₁₀₀ Platten bestimmt.

Durch Auswahl bestimmter Shine-Dalgarno-Sequenzen lassen sich somit die Produktion des AIDA-I-Fusionsproteins und die Kolonisierung rekombinanter *Salmonella*-Stämme modulieren.

3.1.2 Darstellung des OVA-Epitops auf der Innenseite der äußeren Membran attenuierter *Salmonella*-Stämme als Fusionsprotein mit dem Braun'schen Lipoprotein

Das Braun'sche Lipoprotein (Lpp) kommt in großen Mengen in der *E. coli* Zelle vor (bis zu 2×10^5 Kopien pro Zelle) und dessen Hauptfunktion scheint in der Aufrechterhaltung der Architektur der äußeren Membran zu sein (Hirota *et al.*, 1977). Lpp wird im Cytoplasma als Precursor-Protein synthetisiert und durch die Sec-Transportmaschinerie über die Innenmembran transloziert. Einer N-terminalen Signalpeptid-Sequenz folgt ein Cystein, das an seiner freien Sulfhydrylgruppe durch die Aktivität einer Phosphatidylglycerol:Prolipoprotein Diacylglyceryl-Transferase eine Thioetherbindung mit einer Diacylglyceringruppe bildet (Hayashi *et al.*, 1985). Die Signalpeptid-Sequenz wird daraufhin durch die Signalpeptidase II abgespalten, und das nun N-terminal liegende, modifizierte Cystein wird an seinem freien Aminoende acyliert (Hayashi *et al.*, 1985). Das reife Lpp ist nun vollständig modifiziert und wird durch ein ABC-Transportersystem, bestehend aus LolC, LolD und LolE, von der Innenmembran freigesetzt und bindet an das Chaperon LolA (Matsuyama *et al.*, 1995; Yakushi *et al.*, 2000). LolA transportiert Lpp zur äußeren Membran. Durch Interaktion mit dem Lipoprotein LolB, lokalisiert in der äußeren Membran, wird Lpp in die äußere Membran inkorporiert (Matsuyama *et al.*, 1997; Yokota *et al.*, 1999). Das Braun'sche Lipoprotein kann dabei in zwei Formen vorkommen: frei oder gebunden an das Murein; dabei kommt die freie Form doppelt so oft vor wie die gebundene (Bosch und Braun, 1973; Braun und Sieglin, 1970; Inouye *et al.*, 1972; Lee und Inouye, 1974). Die kovalente Verknüpfung mit dem Murein erfolgt mit der ϵ -Aminogruppe des Carboxy-terminalen Lysinrests. Lpp liegt als Trimer vor (Choi *et al.*, 1986; Shu *et al.*, 2000) und wahrscheinlich geht ein Monomer pro Trimer eine kovalente Bindung mit dem Peptidoglycan ein (Shu *et al.*, 2000).

3.1.2.1 Konstruktion von *lpp-ova-ha* Fusionen

Die Aufklärung der Kristallstruktur des Braun'sche Lipoproteins (Lpp) ohne N-Terminus und C-terminales Lysin (Shu *et al.*, 2000) zeigte, dass ein großer Bereich des Proteins eine α -helikale Struktur aufweist, die zur Trimerisierung des Lpp beiträgt. Der äußerste C-Terminus (Arginin, Position 57 des reifen Proteins) scheint aber frei zugänglich und Fusionen daran sollten verträglich sein. Diese Strategie würde auch die Synthese des Fusionsproteins als Lipoprotein gewährleisten, da der N-Terminus dem des nativen Lpp entspricht und gezeigt wurde, dass die Signalpeptidsequenz inklusive des stromabwärts gelegene Cystein

ausreichen, um ein Protein als Lipoprotein in der äußeren Membran darzustellen (Oudega *et al.*, 1993). Es stellte sich nun die Frage ob die Fusionen N-, C-terminal oder anstelle des C-terminalen Lysins, das für die kovalente Verknüpfung mit dem Murein verantwortlich ist (Braun und Wolff, 1970), konstruiert werden sollten.

Dazu wurden verschiedene Variationen des *lpp* amplifiziert mit *KpnI* und *XbaI* hydrolysiert und in den ebenso behandelten Vektor pBAD18 (Guzman *et al.*, 1995) transferiert:

a) eine *BglII* Erkennungssequenz wurde stromabwärts des C-terminalen Lysins durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden KRI42/KRI48 eingefügt und nach Subklonierung in den pBAD18-Vektor wurde pKRI14 erhalten.

b) eine *BglII* Erkennungssequenz stromaufwärts des C-terminalen Lysins wurde durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden KRI43/KRI48 inseriert. Durch Einfügen des DNA-Fragments in den pBAD18-Vektor wurde pKRI15 konstruiert.

c) eine *BglII* Erkennungssequenz wurde anstelle des Lysincodons durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden KRI44/KRI48 eingesetzt und durch Subklonierung des Amplikons in pBAD18 wurde das Plasmid pKRI16 hergestellt.

Die *ova-ha* DNA-Region wurde vom Plasmid pKRI4 (siehe Kapitel 3.2.1.1) mit den Oligonukleotiden KRI49 und KRI51 durch PCR amplifiziert, mit *BamHI* verdaut und in die mit *BglII* linearisierten Plasmide pKRI14, pKRI15 und pKRI16 inseriert. Dadurch entstanden die Plasmide pKRI33, pKRI27 und pKRI29. Nun sollte untersucht werden, ob die Fusionsproteine in der äußeren Membran lokalisiert sind und in das Periplasma ragen. Weiterhin wurde der Einfluss der Synthese auf das Zellwachstum und auf die Integrität der äußeren Membran analysiert.

3.1.2.2 Lokalisation von Lpp-OVA Fusionsproteinen in der äußeren Membran von attenuierten *Salmonella*-Stämmen und Einfluss auf das Wachstum

Die Plasmide pKRI27, pKRI29 und pKRI33 wurden in den *Salmonella* Stamm CREA0293 transformiert. Zellen wurden bei 37°C in Soja-LB kultiviert und am nächsten Tag in frisches Medium 1:100 überimpft. Bei einer OD₆₀₀ erfolgte die Zugabe von Arabinose (0,2% (w/v) Endkonzentration) und die Kulturen wurden für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und Lysate einer SDS-PAGE unterworfen (Abb. 11). Die Immunoblotanalysen mit einem monoklonalen α-HA-Antikörper zeigten die Synthese der Fusionsproteine.

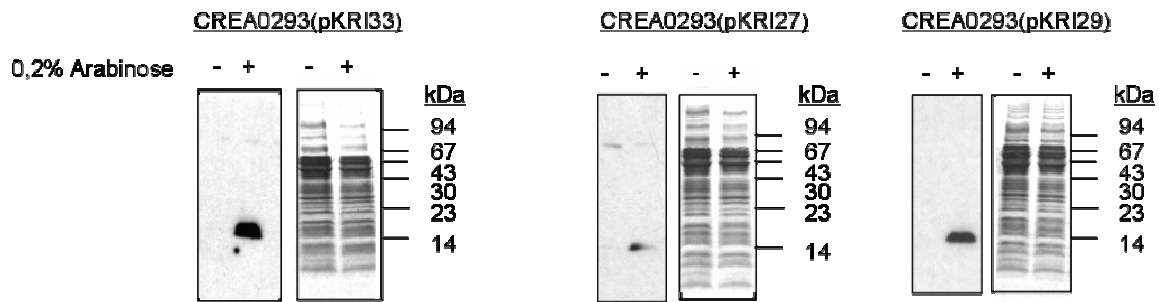


Abb. 11: Synthese der Lpp-OVA-Varianten in CREA0293. Rekombinante CREA0293-Stämme wurden in Soja-LB kultiviert und bei einer $OD_{600} \sim 0,4$ wurde Arabinose (Endkonzentration 0,2% (w/v)) hinzugefügt. Zellysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue G-250 angefärbt (jeweils rechts) oder einer Immunoblotanalyse mit einem α -HA Antikörper unterzogen (jeweils links).

Um festzustellen, ob die Lpp-OVA-Varianten in der äußeren Membran lokalisiert sind, aber nicht aus der Zelle ragen, wurden rekombinante induzierte *Salmonella*-Stämme mit Trypsin oder PBS behandelt und anschließend wurde die äußere Membran isoliert und analysiert.

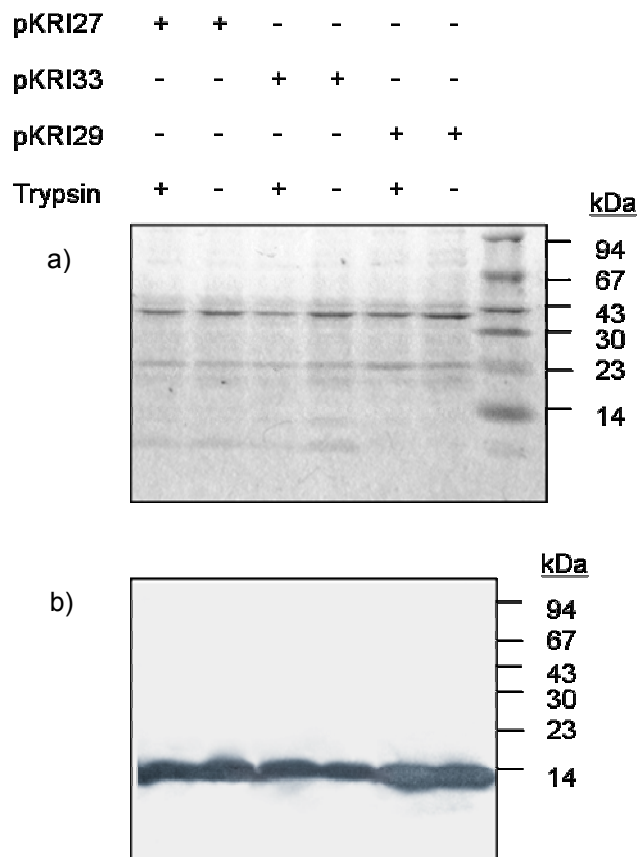


Abb. 12: Trypsin zugänglichkeit der Lpp-OVA-Fusionen in intakten CREA0293 Zellen. Kulturen in Soja-LB wurden bei einer $OD_{600} \sim 0,4$ mit Arabinose induziert und nach 4h geerntet. Zellen wurden mit Trypsin oder PBS behandelt, anschließend lysiert und die äußere Membran präpariert. (a) Coomassie Blue G-250-gefärbtes PAA-Gel. (b) Western-Blot-Analyse mit einem α -HA Antikörper.

Abb. 12 zeigt deutlich, dass die Fusionsproteine in intakten *Salmonella*-Zellen nicht für Proteasen zugänglich sind, hingegen konnten die Lpp-OVA-Fusionen in isolierten äußeren

Membranen komplett durch Trypsin verdaut werden (Abb. 13). Diese Ergebnisse zeigen die korrekte Lokalisierung der Fusionsproteine in *Salmonella*.

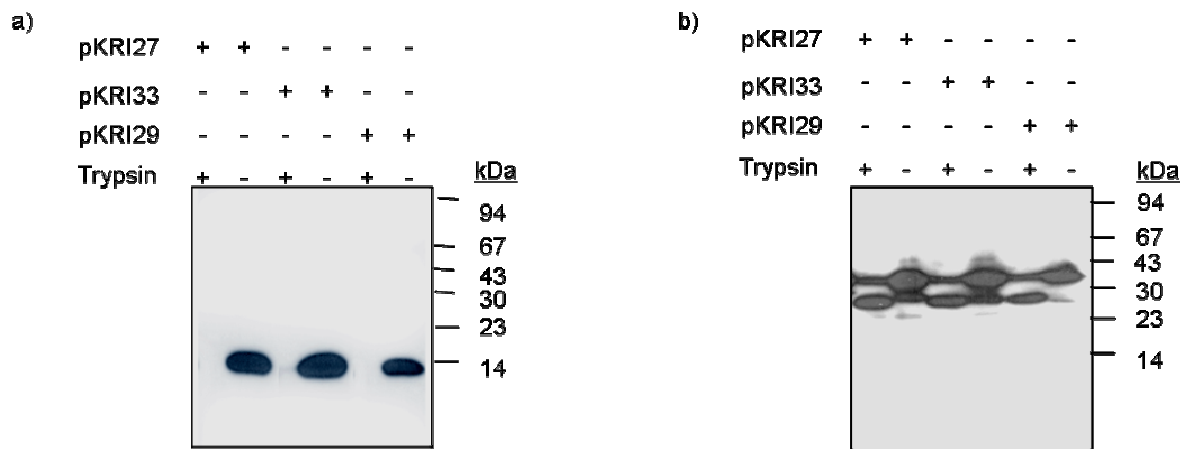


Abb. 13: Trypsin zugänglichkeit der Lpp-OVA Fusionen in isolierten Außenmembranen von rekombinanten Salmonellen. Kulturen von rekombinanten Salmonellen wurden wie beschrieben mit Arabinose induziert. Die Außenmembranen wurden isoliert und entweder mit Trypsin oder PBS behandelt. (a) Western Blot mit einem α -HA Antikörper. (b) Western Blot mit einem α -OmpA Antiserum.

Die durch den P_{BAD} -Promotor regulierte Synthese schien auch nicht das Wachstum rekombinanter *Salmonella*-Stämme in Kultur zu inhibieren, wie die Wachstumskurven in Abb. 14 zeigen. Die Stämme wurden dazu in Soja-LB bei 37°C angezüchtet und in in frisches Soja-LB –Medium überimpft. Wachstumskurven wurden von den Kulturen aufgenommen, die entweder unter induzierenden (0,2% Arabinose (w/v)) oder unter nicht induzierenden (keine Arabinose) Bedingungen kultiviert wurden.

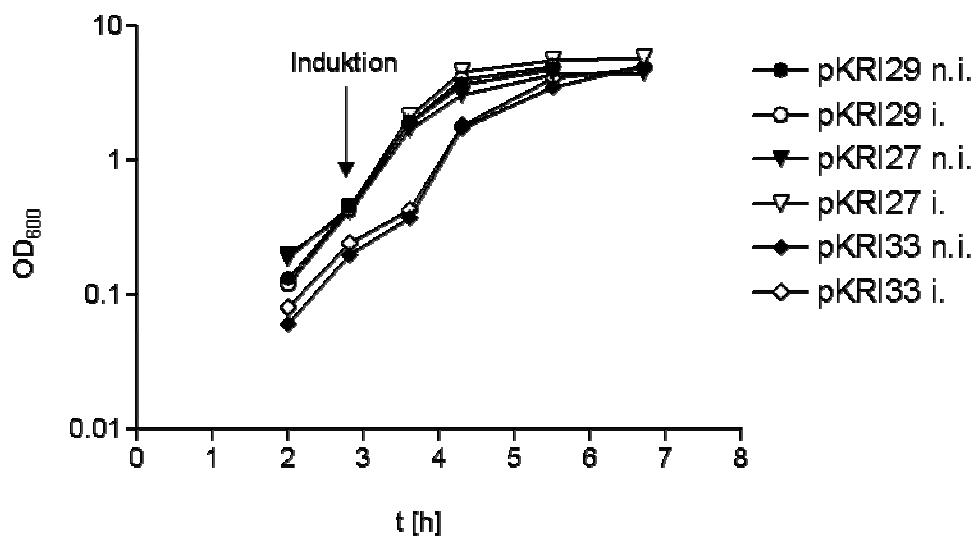


Abb. 14: Einfluss der Synthese von Lpp-OVA-Varianten auf das Wachstum von CREA0293. Rekombinante *Salmonella*-Stämme wurden in Soja-LB kultiviert und bei einer $OD_{600} \sim 0,4$ wurde Arabinose (Endkonzentration 0,2% (w/v)) hinzugefügt oder nicht. Die optische Dichte wurde bei 600 nm zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. i.: induziert mit Arabinose; n.i.: nicht induziert.

3.1.2.3 Konstruktion einer CREA0293 Δ *lpp* Mutante und SDS-Sensitivität rekombinanter *Salmonella*-Stämme

Die Überexpression von Proteinen in der äußeren Membran kann zu einer Störung der Integrität der äußeren Membran führen (Georgiou *et al.*, 1996). Dies äußert sich unter anderem durch eine gesteigerte SDS-Sensitivität der Zellen (Georgiou *et al.*, 1996). Als Positivkontrolle musste ein Stamm konstruiert werden, der eine gesteigerte SDS-Sensitivität aufweist. In Analogie zur Arbeit von Georgiou *et al.* (1996), wurde deshalb eine CREA0293 Δ *lpp* Mutante hergestellt. Dies wurde mit Hilfe des λ -Red Systems bewerkstelligt (Datsenko und Wanner, 2000). Dazu wurden die Oligonukleotide KRI77 und KRI78 mit pKD4 als Matrize verwendet, um das PCR-Produkt zu generieren und zur Deletion einzusetzen. Eine Region im CREA0293 Genom, die einen Teil der 5'-UTR (nicht translatierte Region) und einen Großteil des *lpp* Gens umfaßt, wurde durch dieses Verfahren entfernt. Diese Deletion wurde durch PCR-Analysen verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestimmung der SDS-Sensitivität wurden die Zellen in Soja-LB kultiviert und rekombinante *Salmonella*-Stämme wie beschrieben für 4 h mit Arabinose induziert. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und in PBS zu einer OD₅₉₅ von ~ 0,4 aufgenommen. SDS wurde hinzugefügt (Endkonzentration 0,1% (w/v)) und die Zellsuspensionen bei 37°C schüttelnd inkubiert wurden. Die OD₅₉₅ wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Abb. 32). Der Stamm CREA0293 zeigte dabei eine Abnahme um ca. 15% im Vergleich zur OD am Beginn des Experiments, während beim Δ *lpp* Derivat eine Reduktion der OD um 50% beobachtet wurde. Die Synthese der Lpp-Varianten in Crea0293 führte zu einer erhöhten SDS-Sensitivität im Vergleich zum plasmidlosen Parentalstamm (Abnahme der OD um ca. 35%) (Abb. 15). Die starke Produktion von Lpp-OVA-Fusionsproteinen durch den P_{BAD}-Promotor führte somit zu einer erhöhten Sensitivität der Stämme gegenüber SDS, was auf eine Störung der äußeren Membran durch die hohen Mengen der Lpp-Fusionsproteine zurückzuführen sein könnte.

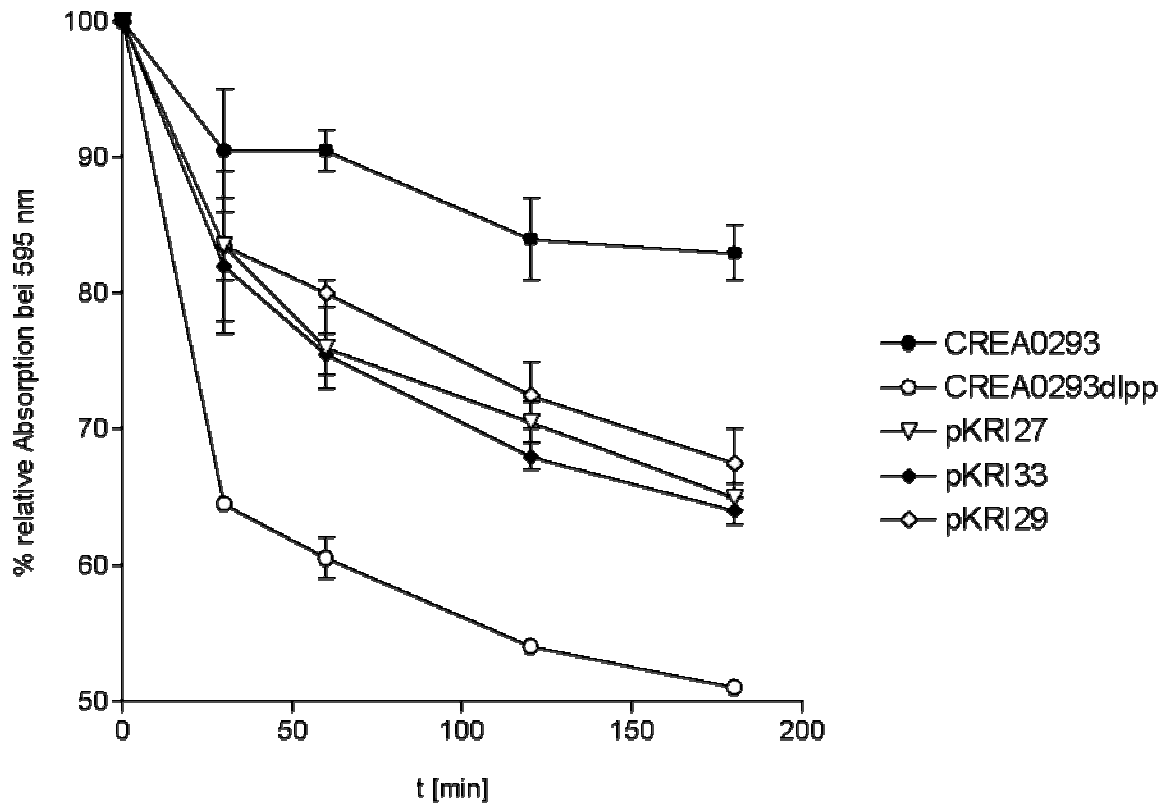


Abb. 15: SDS-Sensitivität Lpp-OVA synthetisierender CREA0293-Stämme. Flüssigkulturen von CREA0293, CREA0293 Δ lpp und mit Arabinose induzierten rekombinanten CREA023-Stämme wurden geerntet und in PBS zu $OD_{595} \sim 0,4$ aufgenommen. SDS wurde hinzugegeben (Endkonzentration 0,1% (w/v)) und die OD_{595} zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Die Werte sind in Prozenten zur Ausgangs-OD angegeben. Gezeigt sind die Resultate aus zwei unabhängigen Experimenten. Der Fehlerbalken kennzeichnet den Standardfehler des Mittelwerts.

3.1.2.4 Modulation der Produktion von Lpp-OVA führt zu veränderten Kolonisierungseigenschaften rekombinanter *Salmonella*-Stämme

Wie bisher gezeigt wurde, werden alle drei verschiedenen Lpp-OVA Fusionen gleich stark gebildet und wiesen die korrekte zelluläre Lokalisierung auf. Zudem konnte keine Beeinträchtigung des Wachstums festgestellt werden und die Integrität der äußeren Membran wurde in allen drei Fällen durch die hohe Produktion der Fusionsproteine, reguliert durch den P_{BAD} -Promotor, gleichermaßen leicht gestört. Für die weiteren *in vivo* Studien wurde deshalb die Fusion aus pKRI27 (Lpp-OVA, ohne C-terminales Lysin) gewählt, um mögliche kovalente Bindungen mit dem Peptidoglycan zu vermeiden.

Um die regulierte Synthese des Lpp-OVA durch den P_{pagC} -Promotor zu ermöglichen, wurde ein *lpp-ova* DNA-Fragment aus pKRI29 mit *NheI* und *HindIII* ausgeschnitten und in pKRI65 (siehe Kapitel 3.1.1.1), das ebenso hydrolysiert wurde, eingefügt und somit *ova-ha-ctB-aida-i* gegen *lpp-ova* ausgetauscht. Das dabei hergestellte Plasmid pKRI104 wurde in den *Salmonella*-Impfstamm CREA1294 transformiert und Mäuse wie beschrieben mit 10^{10} CFU immunisiert und die Kolonisierung in den Peyer'schen Plaques nach 7 Tagen bestimmt. Da keine rekombinanten *Salmonella*-Zellen isoliert werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurden, wie im Fall von AIDA-I, verschiedene RBS Varianten hergestellt. Dabei wurden ausgehend vom Plasmid pKRI29 *lpp-ova* DNA-Fragmente mit Hilfe der Oligonukleotide KOR_RBS7, KOR_RBS8 oder KOR_RBS9/KRI74 durch PCR amplifiziert, mit *KpnI/BglII* hydrolysiert und in den mit den gleichen Enzymen behandelten Vektor pKRI104 eingefügt. Dadurch wurden die Plasmide pKRI181, 182 und 184 generiert (siehe zur Übersicht Tabelle 5).

Tab. 5: Liste der Lpp-OVA codierenden Plasmide für *in vivo* Studien

Plasmid	Promotor	Bemerkungen
pKRI104	<i>pagC</i>	native RBS von <i>lpp</i>
pKRI184	<i>pagC</i>	RBS1
pKRI182	<i>pagC</i>	RBS2
pKRI181	<i>pagC</i>	RBS3

Diese Plasmide wurden in CREA1283 transformiert und erneut Kolonisierungsstudien in BALB/c Mäusen durchgeführt. RBS1 und RBS2 führten wie im Fall von AIDA-I wieder zur besten Kolonisierung (im Bereich von $10^3 - 10^4$ CFU) der Peyer'schen Plaques durch rekombinanten *Salmonella*-Stämme, während RBS3 eine wiederum sehr schlechte Kolonisierung bewirkt (im Bereich von $10^2 - 7 \times 10^3$ CFU) (Abb. 16).

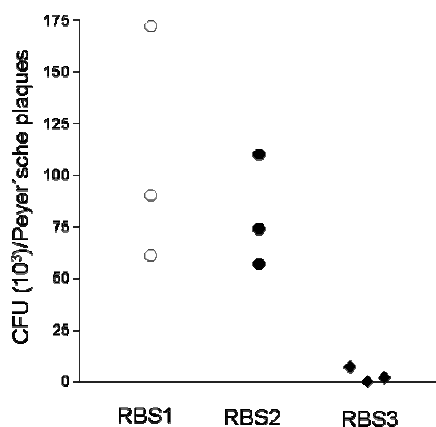


Abb. 16: Modulation der Antigenexpression durch verschiedene RBS-Varianten beeinflusst die Kolonisierungsfähigkeit rekombinanter *Salmonella*-Stämme. Je 3 BALB/c Mäuse wurden mit 10^{10} CFU Lpp-OVA exprimierenden *Salmonellen* immunisiert. Nach 7 Tagen pl wurden die Mäuse getötet und die Bakterienmenge in den Peyer'schen Plaques durch Ausplattieren auf LB-Strep₉₀-Amp₁₀₀ Platten bestimmt.

3.1.3 Darstellung des OVA-Epitops im Periplasma attenuierter *Salmonella*-Stämme mittels dem Galactose-Bindeprotein MglB

MglB ist das periplasmatische Binde-Protein des ABC-Transportapparats für Galaktose Muller, 1985 MULLER1985 /id}. Das *mglBAEC* operon (Muller *et al.*, 1985) codiert weiterhin für die membranassoziierte ATPase MglA (Richarme *et al.*, 1993), die durch ATP-Hydrolyse die Energie für den Galaktose-Transport in das Cytoplasma bereitstellt, und für die Membranproteine MglE und MglC (Richarme und Kohiyama, 1992). Zusätzlich ist MglB in *E. coli* mit der Galaktose-Chemotaxis involviert, indem es mit dem Chemotransducer Trg und mit einem Komplex bestehend MglC und MglE interagiert. Ähnlich wie das kommerzielle MalE-Expressionssystem (Invitrogen®), bei dem das Maltose Binde-Protein als Fusionspartner zur Überexpression von heterologen Proteinen eingesetzt wird, sollte MglB hier zu Präsentation von Antigenen im Periplasma attenuierter *Salmonella*-Stämme entwickelt und eingesetzt werden.

3.1.3.1 Konstruktion einer *ova-ha-mglB* Fusion

Der N- und C-Terminus des reifen MglB ist nach Kristallstrukturdaten (Vyas *et al.*, 1988) frei zugänglich. In dieser Arbeit wurde aus klonierungstechnischen Überlegungen die Strategie gewählt, das OVA-Epitop N-terminal an das reife MglB zu fusionieren. Der Export in das Periplasma sollte durch das Cholera-toxin-Signalpeptid gewährleistet werden.

Aus chromosomaler DNA von *E. coli* DH5 α wurde die DNA-Sequenz für das reife MglB mit den Oligonukleotiden KRI29 und KRI40 amplifiziert, mit *NheI* und *XbaI* geschnitten und in den ebenso hydrolysierten Vektor pBAD18 (Guzman *et al.*, 1995) subkloniert. Daraus entstand das Plasmid pKRI25. Ein DNA-Fragment, das für die Cholera-toxin-Signalpeptidsequenz, OVA und HA codiert, wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden KRI33 und KRI47 aus pKRI24 (codiert für ein OVA-HA-CTB-AIDA-I Fusionsprotein, siehe Kapitel 3.1.1.1) amplifiziert, mit *NheI* hydrolysiert und in das ebenso verdaute Plasmid pKRI25 transferiert. Das resultierende Plasmid pKRI63 codierte somit für eine OVA-HA-MglB Fusion. (Abb. 17). Für die Expression des Fusionsproteins unter P_{pagC} -Kontrolle wurde das Plasmid pKRI63 mit *BglII* und *HindIII* hydrolysiert und ein *ha-mglB*-DNA-Fragment in die ebenfalls mit *BglII* und *HindIII* verdauten Plasmide pKRI171, 172 und pKRI175 (siehe Kapitel 3.1.1.4, Tab. 2) verschoben. Dadurch wurde ein *ha-ctb-aida-i* Fragment gegen ein *ha-mglB*-Fragment ausgetauscht. Tab. 6 gibt eine Übersicht über die hergestellten Plasmide.

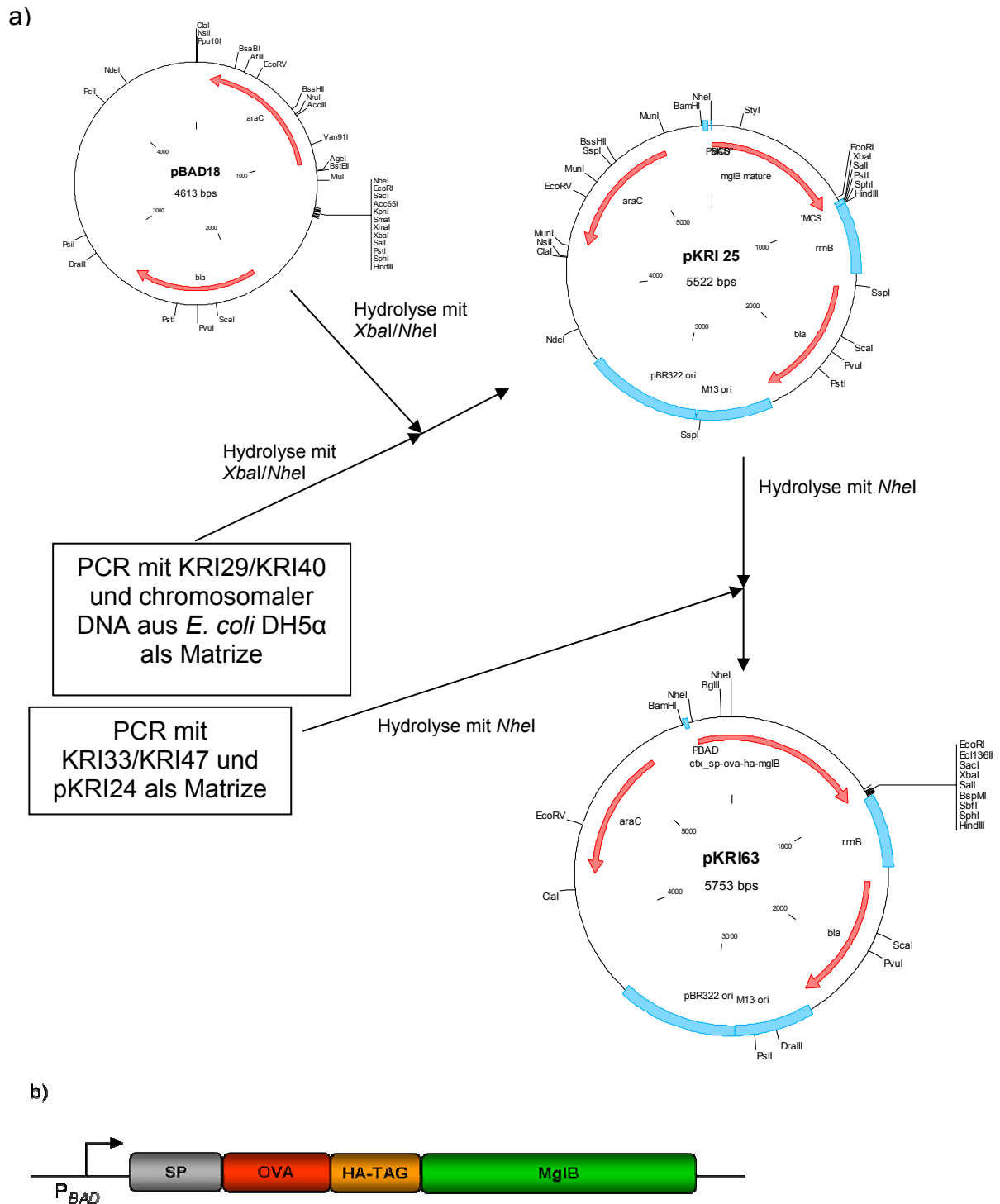


Abb. 17. Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für pKRI63. (a) Einzelheiten siehe Text. (b) Schematische Darstellung des von pKRI63 codierten MgIB-Fusionsproteins. HA-Tag: B-Zell-Epitop des Hämagglutinin aus dem humanen Influenzavirus; MgIB: reifes Galactose-Bindeprotein; OVA: Aminosäuren 319-343 des Ovalbumins; SP: Signalpeptid aus Cholera toxin B

Tab. 6: Liste der OVA-HA-MgIB codierenden Plasmide

Plasmid	Promotor	Bemerkungen
pKRI63	<i>araBAD</i>	-
pKRI178	<i>pagC</i>	RBS1
pKRI186	<i>pagC</i>	RBS2
pKRI187	<i>pagC</i>	RBS3

3.1.3.2 Einfluss der OVA-HA-MgIB Synthese im *Salmonella*-Stamm CREA0293 auf das Wachstum und periplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins

Eine starke Produktion von Fremdproteinen kann sich unter Umständen negativ auf das Wachstum rekombinanter Bakterien auswirken, was wiederum die Kolonisierungsfähigkeit *in vivo* verschlechtern könnte. Deshalb wurden die Plasmide pKRI63 und der leere Vektor pBAD18 in den *Salmonella*-Stamm CREA0293 transformiert und Wachstumskurven in LB-Medium unter induzierenden (0,2 % Arabinose) und nicht induzierenden (keine Arabinose) Bedingungen erstellt (Abb. 18).

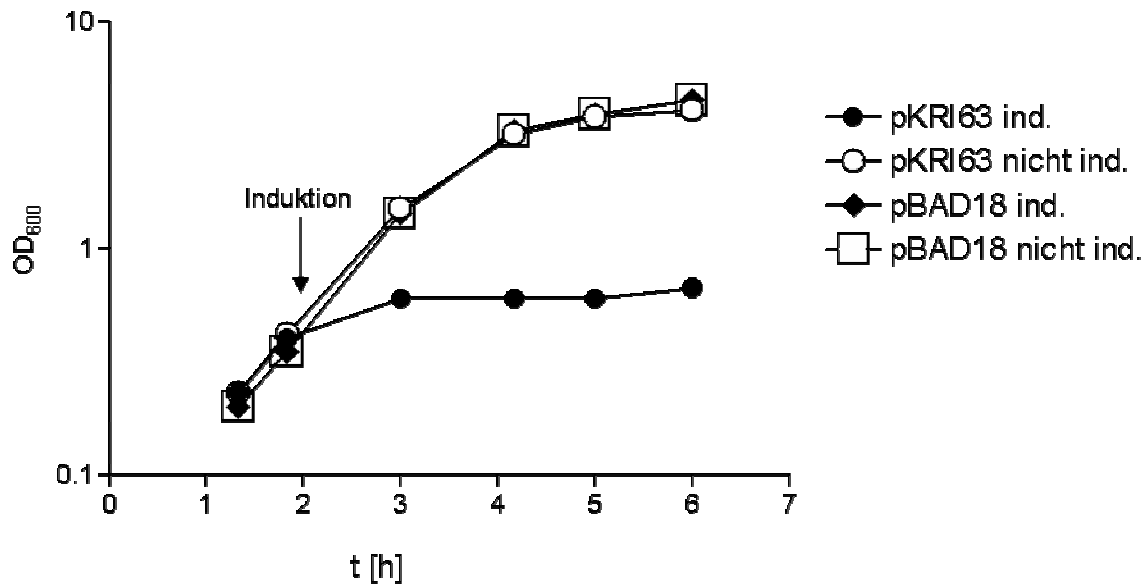


Abb. 18: Einfluss der Synthese von OVA-HA-MgIB auf das Wachstum rekombinanter *Salmonella*-Stämme. Der attenuierte *Salmonella*-Stamm CREA0293 wurde mit den Plasmiden pKRI63 oder pBAD18 transformiert. Frisches LB Medium wurde mit Übernachtskulturen 1:100 angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 wurde Arabinose ad 0,2% (w/v) hinzugegeben oder nicht. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Induktion.

Alle nicht induzierten Kulturen wuchsen ungehindert, während die Induktion nur bei CREA0293(pKRI63) zu einem Wachstumsstopp führte. Eine hohe Expression des Fusionsproteins zeigte sich also wachstumshemmend auf CREA0293.

Um die periplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins in CREA0293(pKRI63) nachzuweisen, wurden logarithmische Bakterienkulturen für 4h bei 37°C mit 0,2% Arabinose induziert. Aus den geernteten Zellen wurde das Periplasma nach der „Chloroform-Methode“ (Ames *et al.*, 1984) isoliert und Zellysate und Periplasma durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Fusionsprotein ließ sich mit Coomassie Blue G-250 (Abb. 19a), dem monoklonalen α -HA-Antikörper (Abb. 19b) oder einem α -Ovalbumin Serum (nicht gezeigt) eindeutig im Zellysat als auch im Periplasma anfärben.

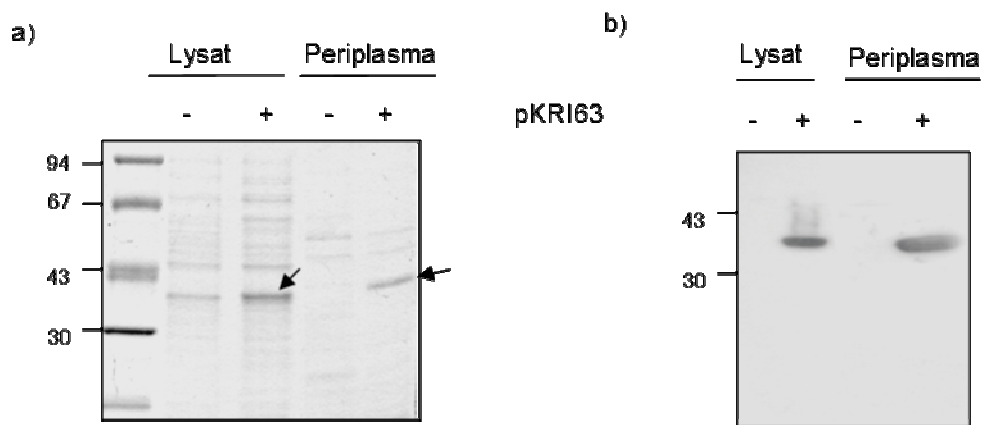


Abb. 19: Nachweis von OVA-HA-MgIB im Periplasma von CREA0293(pKRI63). LB-Flüssigkulturen von CREA0293 und CREA0293(pKRI63) wurden bei einer $OD_{600} = 0,4$ mit 0,2% Arabinose versetzt und 4h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Zellen wurden geerntet und das Periplasma nach der Chloroform-Methode isoliert. Zellysate und Periplasma (5% der Gesamtpräparation) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. (a) Coomassie Blue G-250-gefärbtes PAA-Gel. (b) Immunoblot mit einem monoklonalen α -HA-Antikörper. Pfeile kennzeichnen das Fusionsprotein.

3.1.3.3 Die Modulation der OVA-HA-MgIB Proteinmenge durch verschiedene RBS-Varianten beeinflusst die Kolonisierung attenuierter *Salmonella*-Stämme

Wie in Kapitel 3.1.1.4 gezeigt wurde, kann durch Modulation der Proteinmenge eines heterologen Proteins die Kolonisierungsfähigkeit rekombinanter *Salmonella*-Stämme dramatisch variiert werden. Ob dieser Effekt auch bei der Produktion von OVA-HA-MgIB zu beobachten ist, sollten Immunisierungsexperimente mit dem *Salmonella*-Stamm CREA1283 klären, der mit den Plasmiden pKRI178, pKRI186 oder pKRI187 (siehe Tab. 6) transformiert wurde. BALB/c Mäuse wurden deshalb mit 10^{10} CFU rekombinanter *Salmonella*-Stämme immunisiert und die Bakterienmenge wurde nach 7 Tagen in den Peyer'schen Plaques analysiert (Abb. 20).

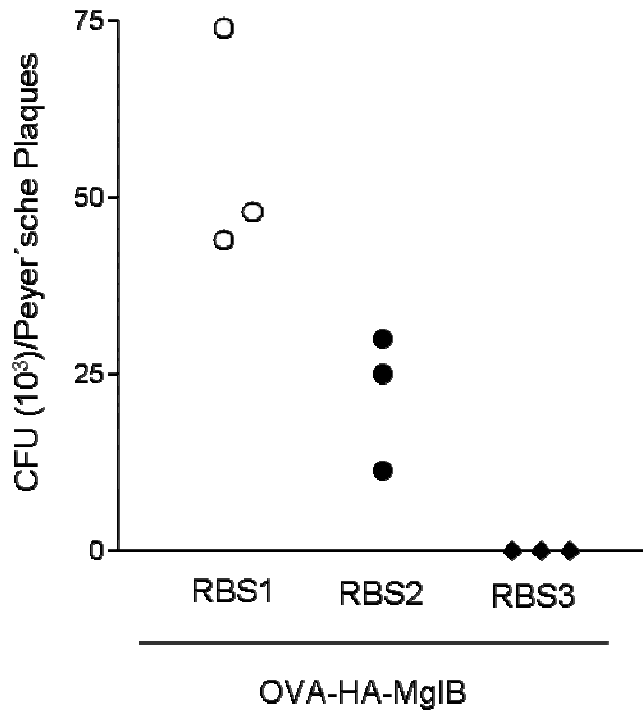


Abb. 20: Die Modulation der Proteinmenge von OVA-HA-MgIB durch RBS-Varianten in CREA1283 und der Einfluss auf die Kolonisierung *in vivo*. Je 3 BALB/c Mäuse wurden mit 1×10^{10} CFU rekombinanter CREA1283-Stämme immunisiert und nach 7 Tagen getötet. Die Peyer'schen Plaques wurden entnommen, homogenisiert und Verdünnungsreihen auf LB-Amp₁₀₀-Strep₉₀-Platten ausplattiert.

Wie in Kapiteln 3.1.1.4 und 3.1.2.4 gezeigt, bewirkte auch bei der Synthese von OVA-HA-MgIB die RBS1 die höchste ($44-74 \times 10^3$ CFU), RBS2 eine mittlere ($11-30 \times 10^3$ CFU) und RBS3 die schlechteste Kolonisierung (0 CFU). Somit lässt sich auch im Fall der Expression von OVA-HA-MgIB durch Variationen der RBS ein breites Spektrum unterschiedlich kolonisierender *Salmonella*-Stämme erzeugen.

3.2 T-Zell-Aktivierung im OVA-Modell in Abhängigkeit von der Antigenlokalisierung in rekombinanten *Salmonella*-Vakzinstämmen

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen *Salmonella*-Stämme sollten im OVA-Modell untersucht werden, um den Einfluss der Antigenlokalisierung auf die frühe Induktion der CD4⁺-T-Zell-Antwort aufzuklären.

3.2.1 CTB-AIDA-I hat keinen immunstimulatorischen Einfluss *in vivo*

Das in Kapitel 3.1.1 beschriebene OVA-CTB-AIDA-Fusionsprotein enthält Teile des Pathogenitätsfaktor AIDA-I (Benz und Schmidt, 1989) und ein cysteinloses CTB. Beide Komponenten könnten die Immunantworten gegen die rekombinanten *Salmonella*-Vakzinstämme verstärken, was potentiell die Interpretation der Ovalbumin-spezifischen T-Zellantworten verfälschen könnte. Um den hypothetischen Einfluss von AIDA-I und CTB zu testen, wurden *Salmonella*-Stämme verglichen, die entweder GFP-OVA allein, oder zusammen mit einem HA-CTB-AIDA Fusionsprotein bildeten.

3.2.1.1 Konstruktion

Ein *ha-ctB-aida-i* DNA-Fragment wurde vom Plasmid pLAT260 mit den Oligonukleotiden KRI38 und KRI39 durch PCR amplifiziert, mit *Xba*I und *Nco*I verdaut und in den mit den gleichen Enzymen behandelten Vektor pKRI65 eingefügt. RBS1 wurde in das so generierte Plasmid pKRI67 wie in Kapitel 3.1.1.4 beschrieben, wobei das Plasmid pKRI176 entstand. pKRI176 wurde mit *Nco*I linearisiert und "glatte" Enden mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase erzeugt. Ein *gfp-ova Xba*I/*Hind*III Fragment aus pMW57 (Dr. Dirk Bumann, persönliche Mitteilung) wurde ebenfalls mit T4-DNA-Polymerase behandelt und in pKRI176 eingefügt. Das dabei konstruierte Plasmid pKRI177 enthält somit *ha-ctB-aida-i* und direkt stromabwärts *gfp-ova*, wobei die Expression der Fusionsgene durch den P_{pagC} -Promotor reguliert wird (schematische Darstellung siehe Abb. 21).

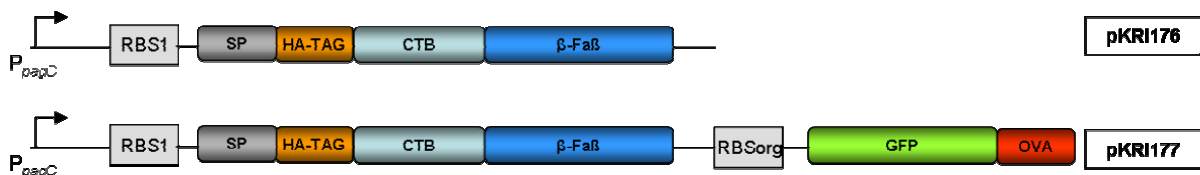


Abb. 21: Schematische Darstellung der auf pKRI176 und pKRI177 codierten Fusionsproteine. Einzelheiten im Text. β -Faß: AIDA-I-Autotransporter-Translokationseinheit; CTB: modifiziertes Cholera-toxin B; HA-Tag: B-Zell-Epitop des Hämagglutinin aus dem humanen Influenzavirus; OVA: Aminosäuren 319-343 des Ovalbumins; SP: Signalpeptid aus Cholera-toxin B; RBSorg: originale Ribosomen-Bindestelle; RBS: Ribosomale Binde-Stelle

3.2.1.2 *In vivo* Versuche

Das Plasmid pKRI177 wurde in CREA1283 transformiert und anschließend wurden drei BALB/c Mäuse mit 10^{10} CFU des rekombinanten *Salmonella*-Stamms orogastrisch infiziert. Nach 5 Tagen wurden die Mäuse getötet, die Peyer'schen Plaques präpariert und homogenisiert. Nach Behandlung mit 0,1% Triton X-100 wurde die GFP-OVA Expression intakter Salmonellen durch Durchflußzytometrie gemessen. Der Median der GFP-Fluoreszenz betrug ca. 50, was in etwa 40000 Kopien GFP-OVA in der *Salmonella*-Zelle entspricht und eine halb-maximale T-Zell-Antwort im OVA-Modell hervorruft (Dr. Dirk Bumann, persönliche Mitteilung). Ein *Salmonella*-Stamm (SL3261(pMW123)), der gleich viel GFP-OVA *in vivo* produziert (Dr. Dirk Bumann, persönliche Mitteilung), wurde für die vergleichende Analyse im OVA-Modell verwendet.

Je 10 chimäre BALB/c Mäuse wurden mit 10^{10} CFU (CREA1283(pKRI177)) bzw. 5×10^8 CFU (SL3261(pMW123)) orogastrisch immunisiert und am Tag 7 pi getötet. Die Peyer'schen Plaques wurden entnommen und die Anzahl der transgenen CD4⁺-T-Zell-Blasten durch bestimmt. Die Kolonisierung der Peyer'schen Plaques durch *Salmonella* unterliegt einer gewissen Streuung und die Anzahl der Ovalbumin-spezifischen Blasten steigt linear mit der Kolonisierung. Um die Daten der T-Zell-Antworten zu normalisieren, wurde der Quotient aus Blasten und CFU der kolonisierenden *Salmonella*-Zellen gebildet.

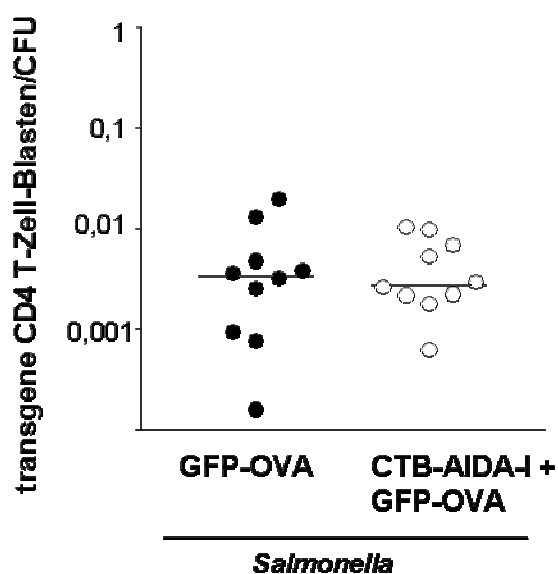


Abb. 22: Die Synthese von HA-CTB-AIDA-I in *Salmonella* hat keinen Adjuvanzeffekt im OVA-Modell. Je 5 chimäre BALB/c Mäuse wurden mit 10^{10} (CREA1283(pKRI177)) bzw. 5×10^8 CFU (SL3261(pMW123)) immunisiert und 7 Tage pi getötet. Die Peyer'schen Plaques wurden entfernt und homogenisiert. Die Zahl der Ovalbumin-spezifischen transgenen CD4⁺-T-Zell-Blasten und die CFU wurde bestimmt. Der Quotient aus Blasten und kolonisierenden *Salmonella* wurde berechnet. Gezeigt sind die Resultate aus zwei unabhängigen Experimenten. Die ausgelösten T-Zell-Antworten in den beiden Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant (ungepaarter Student *t*-Test, $P > 0,5$).

Beide Stämme riefen ähnliche T-Zellantworten hervor (Abb. 22), was den Schluss zulässt, dass die Anwesenheit von CTB-AIDA-I keinen Adjuvanz-Effekt bei *Salmonella*-Impfstämmen

hat. Eventuelle Unterschiede bei der Immunantwort beruhen somit auf der unterschiedlichen Lokalisierung der Antigene.

3.2.2 Kinetik der T-Zellaktivierung und Kolonisierung durch OVA-HA-CTB-AIDA-I produzierende *Salmonella*-Impfstämme

Die maximale Kolonisierung und T-Zellaktivierung in den Peyer'schen Plaques durch Salmonellen, die Antigene im Cytoplasma darstellen, ist an Tag 7 pi zu beobachten (Bumann, 2001a). Da hohe Mengen von OVA-HA-CTB-AIDA-I die Kolonisierung sehr stark beeinträchtigen (siehe Kapitel 3.1.1.4), wäre es möglich, dass die Kinetik der Kolonisierung und T-Zellaktivierung einen anderen Verlauf aufweist. Um aber die Wirksamkeit der Stämme zu vergleichen, die das Ovalbumin-Epitop auf der Zelloberfläche oder im Cytosol ausprägen, sollte auch die Kinetik ähnlich sein. Deshalb wurden zum einen chimäre BALB/c Mäuse mit je 10^{10} CFU CREA1283(pKRI175) (RBS1_OVA-HA-CTB-AIDA-I; siehe Tabelle 4, Kapitel 3.1.1.4) bzw. CREA1283(pKRI176) (RBS1_HA-CTB-AIDA-I; siehe Kapitel 3.2.1.1) immunisiert. Nach 3, 5, 7 und 10 Tagen wurden je 3 Mäuse getötet und die Kolonisierung und Anzahl der T-Zell-Blasten analysiert.

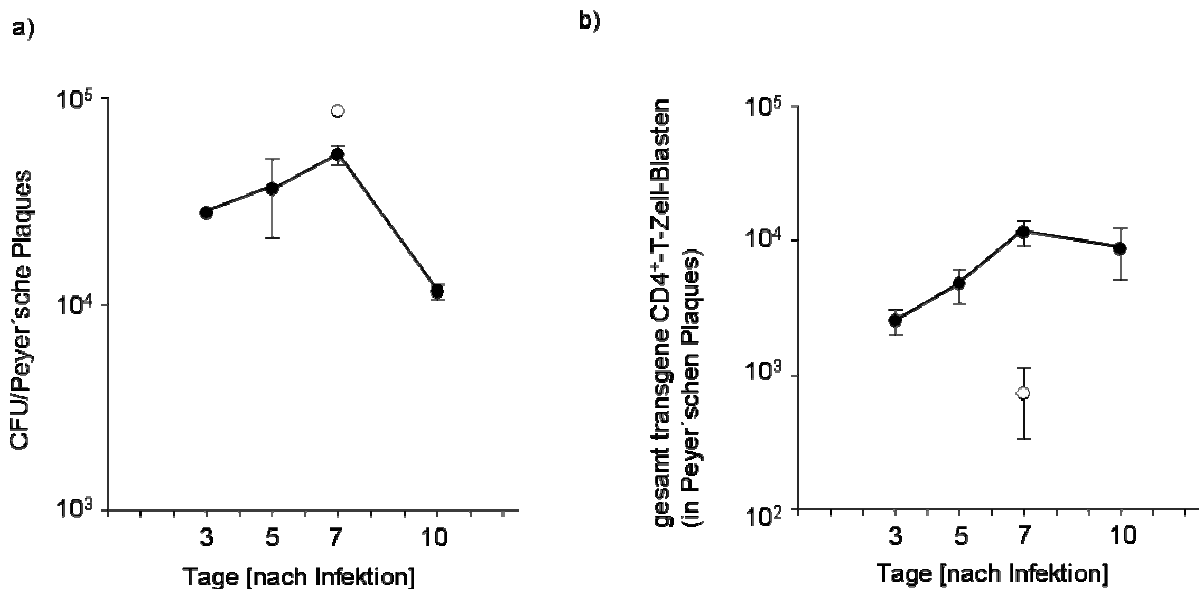


Abb. 23: Kinetik der T-Zellaktivierung und Kolonisierung durch OVA-HA-CTB-AIDA-I synthetisierende *Salmonella*. 12 chimäre BALB/c Mäuse wurden mit 10^{10} CFU CREA1283(pKRI175) und 3 chimäre BALB/c Mäuse mit 10^{10} CFU CREA1283(pKRI176) (Negativkontrolle) immunisiert. Nach 3, 5, 7 und 10 Tagen wurden je 3 Mäuse (Negativkontrolle nur an Tag 7) getötet, und die Kolonisierung und die Anzahl der transgenen CD4⁺-T-Zell-Blasten in den Peyer'schen Plaques wurde bestimmt. (●) CREA1283(pKRI175): RBS1_OVA-HA-CTB-AIDA. (○) CREA1283(pKRI176): RBS1_HA-CTB-AIDA. Gezeigt sind die Mittelwerte, die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts.

Das Maximum der Kolonisierung und T-Zell-Blastenbildung bei Zelloberflächendarstellung des OVA-Epitops ist an Tag 7 pi zu verzeichnen (Abb. 23) und somit analog der Kinetik bei cytoplasmatischer Darstellung von Antigenen. Auch bei stärkerer Synthese des AIDA-I-Fusionsproteins, moduliert durch RBS2, ist das Maximum der Kolonisierung an Tag 7 erreicht (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Einfluss der Lokalisation und Menge von Antigen in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* auf die CD4⁺-T-Zellantwort

Wie in den vorausgegangenen Kapiteln beschrieben, beeinträchtigen große Mengen von OVA fusioniert an AIDA-I, MglB oder Lpp das Kolonisierungsvermögen attenuierter *Salmonella*-Stämme, während Fusionen mit GFP gut toleriert werden. Um abzuschätzen wie hoch die Antigenmenge *in vivo* ist, wurden die entsprechenden Plasmide in den *Salmonella* Stamm CREA0293 transformiert, der eine stärkere Induktion des P_{pagC} -Promotors *in vitro* erlaubt (bis zu 40% des Werts in Peyer'schen Plaques, gemessen durch FACS-Analyse GFP-OVA exprimierender Stämme, Daten nicht gezeigt). Die Stämme wurden in modifiziertem M9-Magnesiummangelmedium (10 μ g $MgSO_4$) bei 37°C gezüchtet, die Zellen durch milde Zentrifugation geerntet (4500 rpm, 5 min, 4°C) und die Zellsedimente in frischem Medium zu einer OD₅₉₅ von 0,4 verdünnt und für 5 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, und Lysate wurden hergestellt. Zudem wurde der Kulturüberstand sterilfiltriert (0,2 μ m Filter) und entweder ultrazentrifugiert (100.000 x g, 1 h, 4°C) oder mit 5% TCA präzipitiert. Die Sedimente wurden in PBS aufgenommen, mit dem gleichen Volumen 2 x SDS-Probenpuffer vermischt und 10 min gekocht. Die Zell-Lysate und Überstandspräparate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und Western-Blot Analysen mit einem α -Ovalbumin Antiserum unterzogen (Abb. 24). Die maximale Antigenmenge, mit der immer noch eine gute Kolonisierung erreichbar war, ist je Fusionspartner unterschiedlich. Die Analyse der Kulturüberstände zeigte, dass bei starker Produktion des AIDA-I-Fusionsproteins, abgespaltene Passagierdomänen (~ 30 kDa) in das Medium freigesetzt wurden. Zudem konnte auch eine Freisetzung von Lpp-OVA beobachtet werden. In beiden Fällen konnten die Proteine auch in Sedimenten nach Ultrazentrifugation detektiert werden, was für eine Assoziation mit Membranpartikeln spricht. MglB- oder GFP-Fusionsproteine konnten nicht in den jeweiligen Überständen nachgewiesen werden, was gegen eine Freisetzung durch Zellyse spricht.

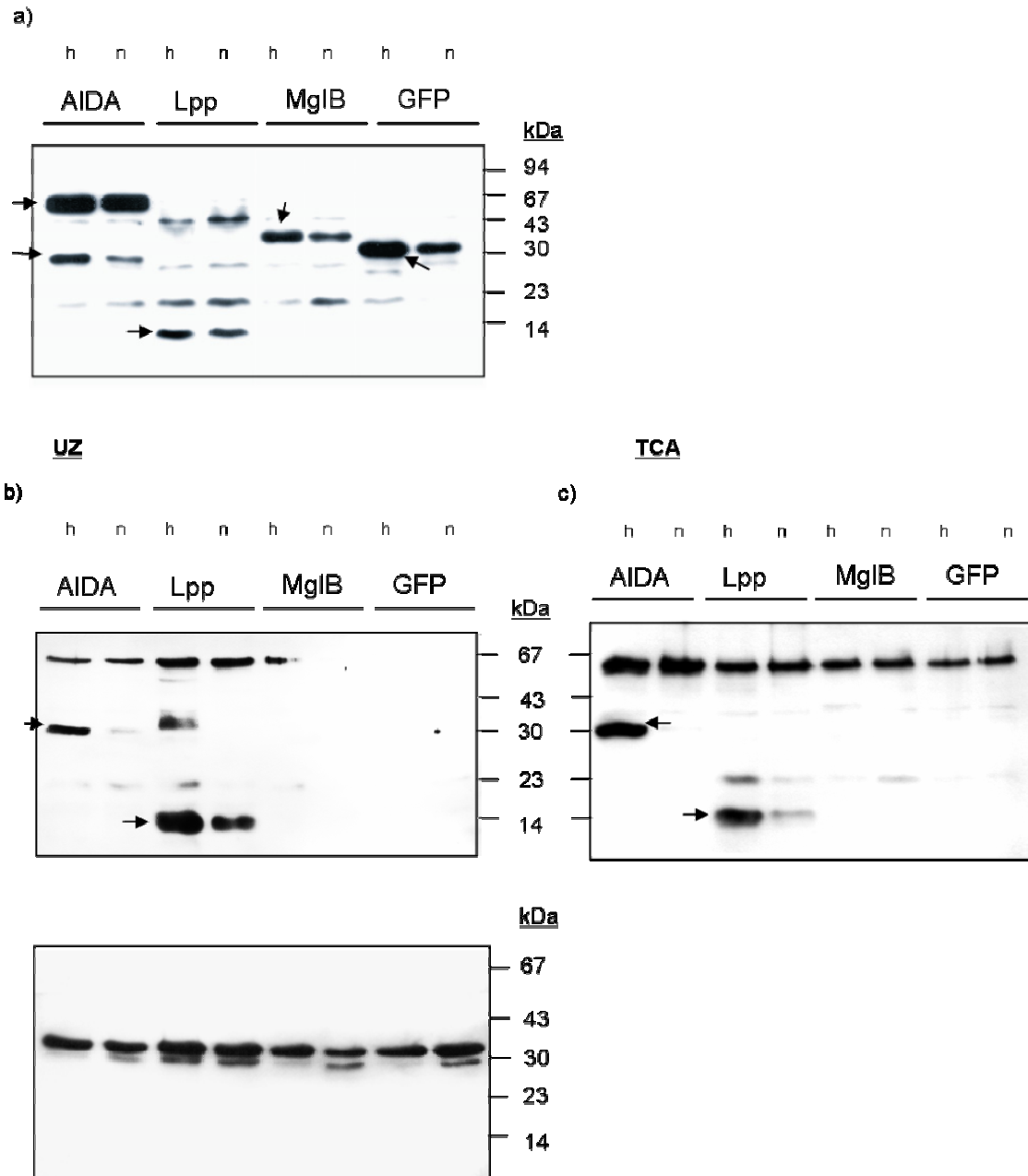


Abb. 24: Synthese der Antigene im *Salmonella*-Stamm CREA0293 unter induzierenden Kulturbedingungen und Analyse der Kulturüberstände. Die Induktion des P_{pagC} -Promotors wurde durch Wachstum der rekombinanten *Salmonella*-Stämme in Mg-armen modifizierten M9 Medium erzielt. (a) Zellysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit einem α -OVA-Antiserum analysiert. Die Kulturüberstände wurden sterilfiltriert (0,2 μ m Filter) und entweder ultrazentrifugiert (b) oder mit 5% TCA präzipitiert (c). Die Sedimente wurden ebenfalls durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit dem α -OVA-Antiserum bzw. im Fall der Sedimente, die nach der Ultrazentrifugation erhalten wurden, auch mit einem α -OmpA-Antikörper (b unten) untersucht. Die Abkürzungen "h" und "n" kennzeichnen eine hohe bzw. niedrige Synthese der Antigene, vermittelt durch die RBS1 oder RBS2. Im Fall von GFP-OVA wurde die hohe bzw. niedrige Produktion durch die Plasmide pMW57 bzw. pKRI177 erreicht.

Um die Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten gegen *Salmonella* zu untersuchen, die das OVA-Epitop in den verschiedenen Kompartimenten präsentieren, wurden die zellulären

Immunantworten mit einer gesättigten Immunantwort, die durch eine sättigende Produktion von GFP-OVA hervorgerufen wird, verglichen. Diese Antwort lässt sich auch durch eine vermehrte Synthese von GFP-OVA nicht steigern (Dr. Dirk Bumann, persönliche Mitteilung).

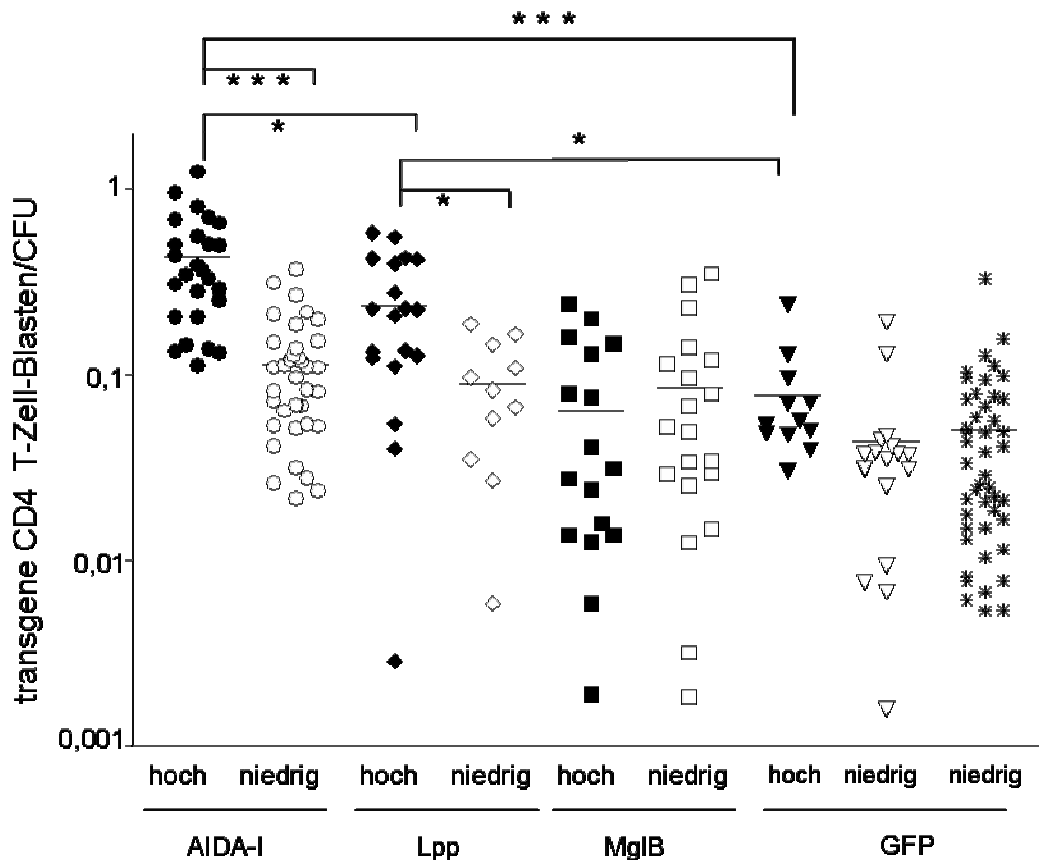


Abb. 25: Einfluss der Lokalisation und Menge von Antigen in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* auf die T-Zellantwort im OVA-Modell. Splenocyten aus F1 DO11.10xBALB/c Mäusen wurden einen Tag vor den Immunisierungen in BALB/c Mäuse transferiert. Rekombinante *Salmonella*-Stämme wurden in Dosen von 1×10^{10} CFU appliziert, während *Salmonella*-Stämme, die AIDA-I oder GFP Fusionsproteine in geringeren Mengen produzierten, zum Teil auch in Dosen zwischen 10^8 - 10^{10} CFU verabreicht wurden. Am Tag 7 pi wurden die immunisierten Mäuse getötet, die Peyer'schen Plaques entnommen und homogenisiert. Die Menge an aktivierten T-Zell-Blasten und kolonisierenden *Salmonella* wurde anschließend bestimmt. Das Verhältnis der beiden Werte beschreibt die Immunogenität pro kolonisierender rekombinanter *Salmonella*-Zelle. Hohe bzw. niedrigere Synthese der betreffenden Antigene wurde durch RBS1 bzw. RBS2 vermittelt, wobei die transkriptionelle Regulation der Antigen-Expression durch den P_{pagC} -Promotor erfolgte. Im Fall von GFP-OVA wurde die sättigende Synthese durch das Plasmid pMW57 (Dr. Dirk Bumann, persönliche Mitteilung) erzielt und die halbmaximale sättigende Synthese durch die Plasmide pKRI177 (Sternchen) bzw. pMW123 (leeres Dreieck). Gezeigt sind die Resultate mehrerer unabhängiger Experimente. Die Unterschiede in der Immunogenität wurden durch den ungepaarten Student t-Test berechnet: ***, $P < 0,0001$; *, $P < 0,01$. Der Mittelwert ist als horizontaler Balken dargestellt.

TCR-transgene CD4⁺-T-Zellen wurden einen Tag vor der Immunisierung in syngene BALB/c Mäuse transferiert. 7 Tage pi wurde die Kolonisierung (siehe Tab. 7) und T-Zell-Blastenbildung in den Peyer'schen Plaques bestimmt. Eine niedrige Synthese der Antigene

ließ keine wesentlichen Unterschiede in der T-Zellantwort erkennen (Abb. 25). Ein erhöhtes Antigenniveau von OVA-MglB führte zu keiner Steigerung der Immunogenität, ebenso wenig im Fall der cytoplasmatischen Präsentation von GFP-OVA (Dr. Dirk Bumann, persönliche Mitteilung). Wurde jedoch das AIDA-I- oder Lpp-Fusionsprotein in höheren Mengen produziert, konnte eine verstärkte Immunantwort verzeichnet werden, die signifikant höher war als bei periplasmatisch oder cytoplasmatischen Antigenen. Dabei war die Immunogenität des von OVA-AIDA-I höher als Lpp-OVA.

Dies lässt den Schluss zu, dass hohe Mengen von Antigenen in der äußeren Membran immunogener sind als periplasmatische oder cytoplasmatische.

Tab. 7: Kolonisierung der Peyer'schen Plaques durch rekombinante *Salmonella*-Stämme. Chimäre Mäuse wurden mit 10^{10} CFU rekombinanter *Salmonella*-Stämme immunisiert und 7 Tage pi getötet. Die Bakterienmenge in den Peyer'schen Plaques wurde durch Ausplattieren von geeigneten Verdünnungen auf LB-Amp₁₀₀-Strep₉₀ bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert und der jeweilige Standardfehler des Mittelwerts.

	AIDA _{hoch}	AIDA _{niedrig}	MglB _{hoch}	MglB _{niedrig}	Lpp _{hoch}	Lpp _{niedrig}	AIDA,GFP	GFP ^a
CFU	13750 ±	44890 ±	33800 ±	48820 ±	52310 ±	73000 ±	66880 ±	98110 ±
	1771	4985	6571	9925	7362	10780	6472	13990
	(n=26)	(n=18)	(n=15)	(n=17)	(n=16)	(n=8)	(n=28)	(n=18)

Da bei hoher Produktion eine Freisetzung der prozessierten Passagierdomäne des AIDA-I Fusionsproteins und des vollständigen Lpp-OVA in den Kulturüberstand beobachtet werden konnte (Abb. 37), wurde versucht, die Antigene in Maus-Makrophagen mit einem α -OVA-Antiserum zu detektieren. Dies gelang aufgrund von technischem Limitationen nicht. Deshalb wurde LPS als Ersatzmarker gewählt, da eine Studie mit Epithelzelle darlegen konnte, dass LPS-haltige Vesikel aus den SCV's (*Salmonella containing vacuoles*) freigesetzt werden (Garcia-del Portillo *et al.*, 1997). Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurden für dieses Experiment GFP-OVA exprimierende Salmonellen verwendet. Zu diesem Zweck wurde der Stamm CREA1283(pKRI71) benutzt, der GFP-OVA unter P_{phoP} -Kontrolle exprimiert. Der Stamm wurde bei 37°C in modifiziertem M9-Magnesium-Mangelmedium angezüchtet, am nächsten Tag geerntet (Median der GFP-OVA Fluoreszenz: 59) und J-774.A1 Makrophagen in einem Verhältnis von 40:1 (Bakterien:Zelle) für 90 min infiziert. Die Zellen wurden fixiert, gewaschen und mit einem α -LPS-Antiserum und einem ALEXA-456 gekoppelten Sekundäntikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte mit einem konfokalen

Mikroskop (Abb. 26). Intrazelluläre Bakterien wurden dadurch gefärbt und vitale Zellen konnten durch ihre grüne Fluoreszenz eindeutig identifiziert werden. Deutlich ist dabei zu erkennen, dass sich LPS-haltiges Material von den lebenden *Salmonella*-Zellen (gekennzeichnet durch grüne Fluoreszenz) abschnürt und sich in den Makrophagen verteilt. Bemerkenswerterweise fand sich kein LPS in nicht-infizierten Makrophagen, was darauf hindeutet, dass von extrazellulären *Salmonella*-Zellen freigesetztes LPS nicht in nennenswerten Mengen phagozytiert wurde.

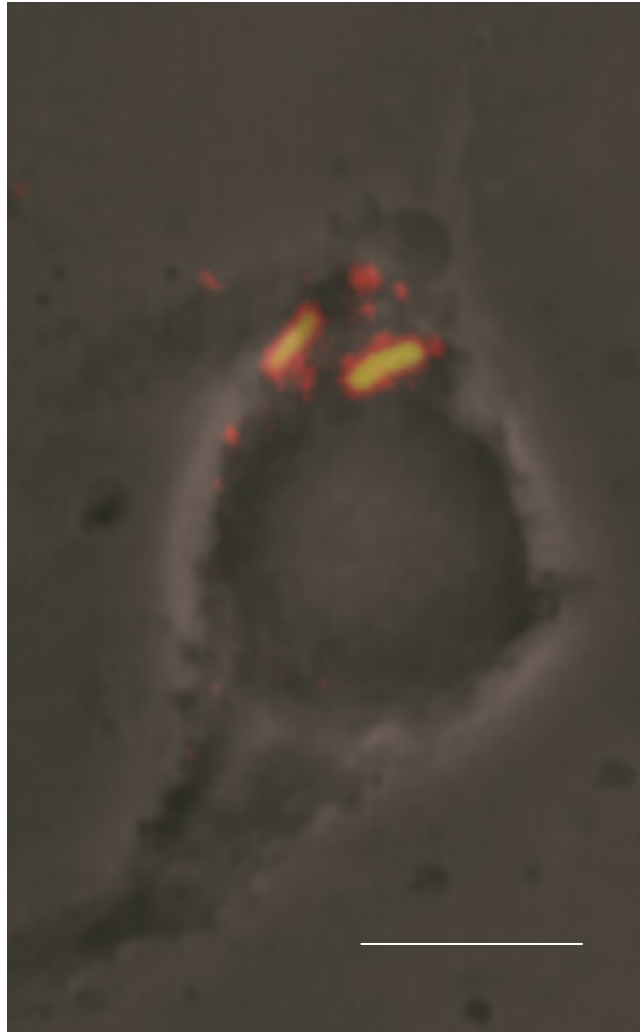


Abb. 26: LPS Färbung von intrazellulären rekombinanten *Salmonella*-Zellen. GFP-OVA ausprägende *Salmonella* (Median der Fluoreszenz: 59) wurden üN in M9-Magnesium-Mangelmedium angezüchtet und J-774.A1 Makrophagen mit einer MOI von 40 infiziert. Nach 90 min Phagozytose wurden die Zellen mit Formalin fixiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden mit TBS-T(0,05% (w/v)) die Membranen permeabilisiert und die Zellen mit einem α -*Salmonella*-Serum und mit einem an ALEXA-546 gekoppelten Ziege- α -Kaninchen-Serum für je 1h gefärbt. Die Analyse erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop (Kanal 1: 515-545 nm zur Detektion von GFP-OVA; Kanal 2: 585-615 nm zu Detektion von Alexa-546). Dargestellt ist die Überlagerung der Fluoreszenz-Kanäle und der Transmissionsaufnahme. Der Balken stellt 4 μ m dar.

3.3 Präsentation von antigenen Determinanten auf der Zelloberfläche von attenuierten *Salmonella*-Stämmen durch den AIDA-I Autotransporter

Die Ergebnisse aus dem OVA-Modell implizieren, dass rekombinante *Salmonella*-Lebendvazine durch die Oberflächenpräsentation von Antigenen optimiert werden können. Nachfolgend sollte untersucht werden, ob zelluläre Immunantworten gegen durch AIDA-I präsentierte antigene Determinanten auch in anderen Modellen hervorgerufen werden können.

3.3.1 Autodisplay des Hsp60₇₄₋₈₆ Epitops aus *Yersinia enterocolitica*

CD4⁺-T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von *Yersinia enterocolitica* durch das Immunsystem (Autenrieth *et al.*, 1992; Autenrieth *et al.*, 1993b; Autenrieth *et al.*, 1993a). T-Zellen, die den Komplex aus MHCII und dem Hsp60₇₄₋₈₆ Epitop erkennen, bewirkten nach adoptivem Transfer in C57BL/6 Mäuse einen deutlichen Schutz gegen eine Belastungsinfektion mit *Yersinia enterocolitica* (Noll *et al.*, 1994). Mit dem AIDA-I Autotransportersystem konnte das Hsp60₇₄₋₇₈ Epitop in *E. coli* auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Konieczny *et al.*, 2000). *In vitro* Experimente zur Antigenpräsentation durch Makrophagen, die mit hitzeinaktivierten, rekombinanten *E. coli*-Zellen inkubiert worden waren, deuteten auf eine funktionale Darstellung des Epitops hin. Hier sollte untersucht werden, ob rekombinante, attenuierte *Salmonella*-Stämme Hsp60₇₄₋₈₆ auf der Zelloberfläche ausprägen können und inwieweit spezifische CD4⁺-T-Effektorzellen *in vivo* durch orale Immunisierung mit diesen Stämmen induzierbar ist.

3.3.1.1 Subklonierung einer *hsp60*₇₄₋₈₆-*ha-ctxB-aida-i* Genfusion in ein *thyA*-stabilisiertes Plasmid

Die Stabilität eines Expressionsvektors ist ein wichtiger Punkt bei der Herstellung eines wirksamen *Salmonella*-Vakzinstamms, um eine ausreichende Antigenexpression *in vivo* zu gewährleisten. In einem *Salmonella*-Stamm, dem ein funktionales Thymidilat-Synthase-Gen (*thyA*) fehlt, kann ein plasmidkodiertes *thyA* Gen diesen Defekt komplementieren. Damit können Expressionsvektoren zum einen in Wachstumsmedium ohne Thymin und zum anderen *in vivo* stabilisiert werden (Morona *et al.*, 1991), da Δ *thyA*-Stämme von *Salmonella* ohne Plasmid in Thymin-armen Bedingungen nicht wachsen können.

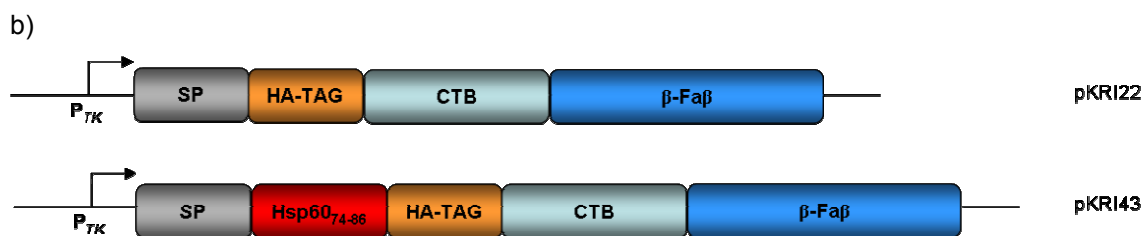
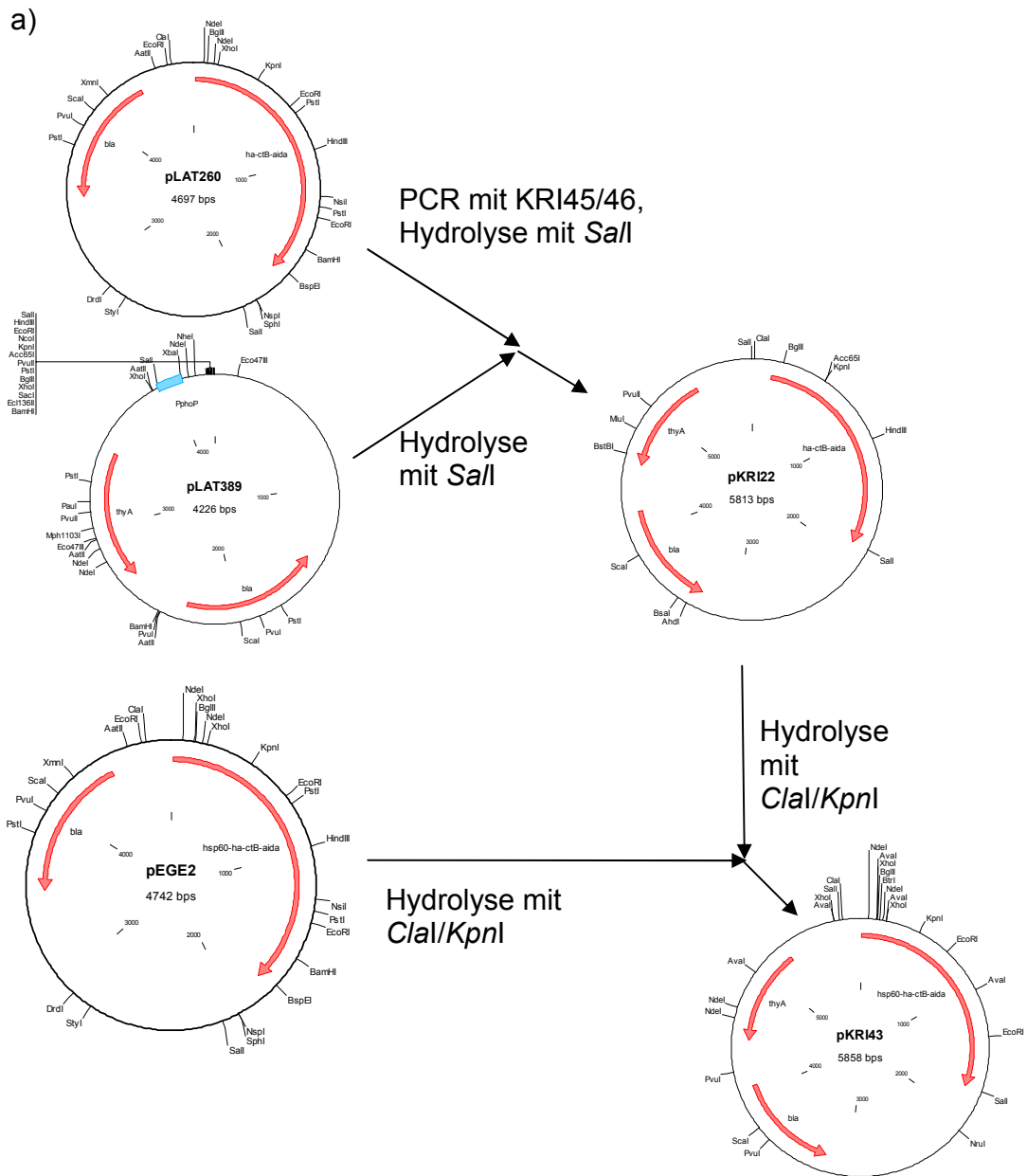


Abb. 27: a) Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für pKRI22 und pKRI43. Einzelheiten im Text; b) β -Fa β : AIDA-I Autotransporter Translokationseinheit; CTB: modifiziertes Cholera toxin B; HA-Tag: B-Zell-Epitop des Hämagglutinin aus dem humanen Influenzavirus; Hsp60₇₄₋₈₆: 13 aa Epitop aus Hsp60 von *Yersinia enterocolitica*; SP: Signalpeptid aus Cholera toxin B

Durch PCR mit den Oligonukleotiden KRI45/46 und pLAT260 als Matrize, wurde ein DNA-Fragment amplifiziert, das den konstitutiven Promotor P_{TK} (Klauser *et al.*, 1990) und *ha-ctxB-aida* umfaßt. Nach Hydrolyse mit *SaII* wurde das Amplikon in den Vektor pLAT389, der ein funktionales *thyA*-Allel enthält, subkloniert (resultierendes Plasmid: pKRI22, Abb. 27). Ein *Clal/KpnI*-Fragment aus pEGE2 (Kramer *et al.*, 2003a), das die *ctxB* Signalpeptid-Sequenz, *hsp60*₇₄₋₈₆, *ha* und das *ctxB* Gen enthält, wurde in pKRI22 transferiert, das ebenfalls mit *Clal/KpnI* geschnitten war. Das daraus resultierende Plasmid pKRI43 codiert für ein Hsp60₇₄₋₈₆-HA-CTB-AIDA-I Fusionsprotein unter der Kontrolle des P_{TK} -Promotors und enthält ein funktionales *thyA* Allel.

Die hergestellten Plasmide wurden in den *thyA*-defizienten *Salmonella*-Stamm CREA1323 transformiert und die Synthese und Oberflächenexposition der AIDA-I Fusionsproteine wurde untersucht.

3.3.1.2 Synthese und Oberflächenexposition von Hsp60₇₄₋₈₆-HA-CTB-AIDA in dem attenuierten *Salmonella* Stamm CREA1323

Um die zelluläre Lokalisation der AIDA-I Fusionsproteine zu überprüfen, wurden die *Salmonella*-Stämme üN bei 37°C auf LB-Platten kultiviert, am nächsten Tag geerntet und die Außenmembran präpariert. Nach SDS-PAGE wurden die Gele mit Coomassie Blue G-250 gefärbt oder einer Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen HA-Antikörper unterzogen (Abb. 28). Hsp60₇₄₋₈₆-HA-CTB-AIDA-I und HA-CTB-AIDA-I konnten dabei eindeutig in der Außenmembran nachgewiesen werden.

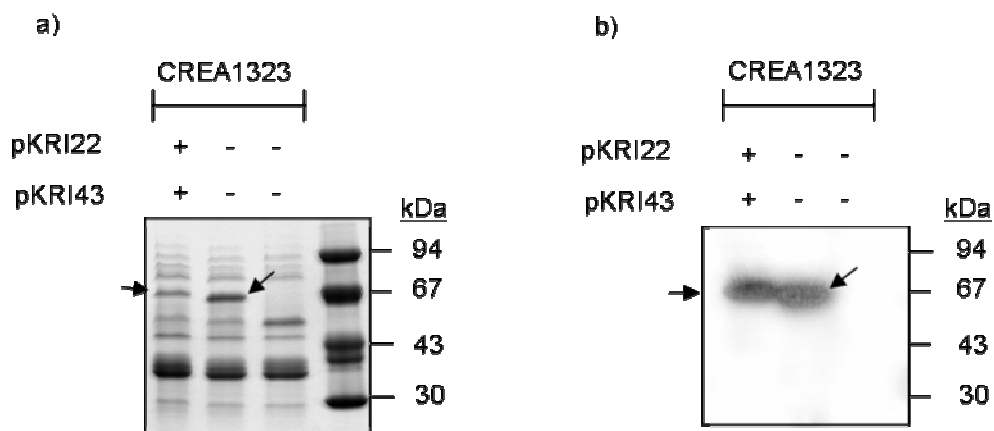


Abb. 28: Hsp60₇₄₋₈₆-HA-CTB-AIDA-I und HA-CTB-AIDA-I werden in der äußeren Membran von *Salmonella* CREA1323 angereichert. Die äußeren Membranen wurden präpariert und einer SDS-PAGE unterzogen. Gele wurden mit Coomassie Blue G-250 gefärbt (a) oder einer Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop unterzogen (b).

Wie aus Abb. 29 ersichtlich, führt die Transformation von CREA1323 mit pKRI22 und pKRI43 zu einer starken Bildung des jeweiligen AIDA-I-Fusionsproteins. Nach einer Trypsinbehandlung physiologisch intakter Zellen konnten die Fusionsproteine weder durch SDS-PAGE-Analyse (Abb. 29a) noch durch Immunoblotanalyse (Abb. 29b) nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Lokalisierung der Passagierdomänen auf der Zelloberfläche. Dieser Befund wurde durch indirekte Immunfluoreszenz unterstützt (Abb. 30). Der HA-spezifische monoklonale Antikörper band spezifisch an CREA1323(pKRI43) Zellen, die Hsp60₇₄₋₈₆-HA-CTB-AIDA-I syntetisierten (Abb. 30a), während der plasmidlose Parentalstamm nicht angefärbt wurde (Abb. 30c).

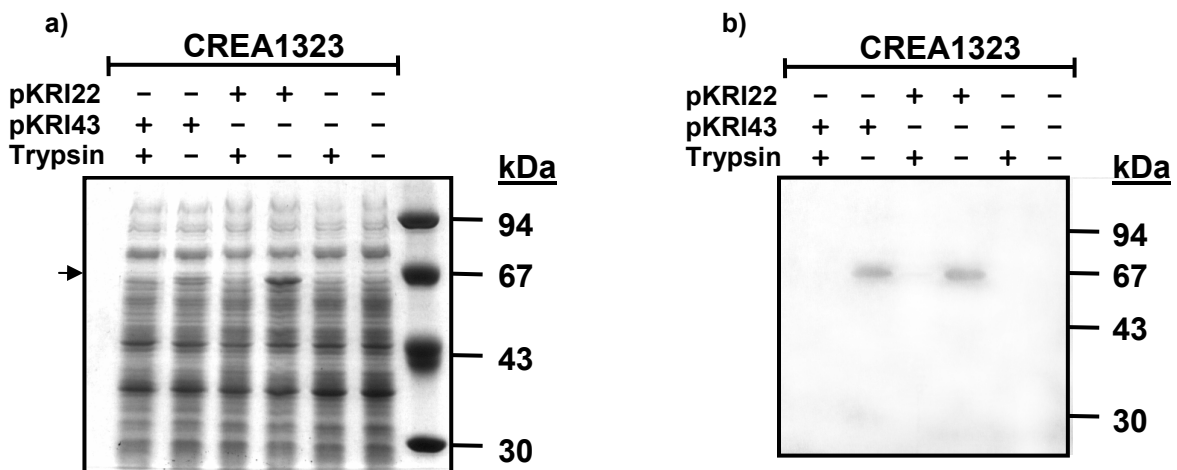


Abb. 29: Bildung von AIDA-I Fusionsproteinen in CRE1323 und Sensitivität gegenüber exogenen Proteasen. Der *Salmonella*-Vakzin Stamm CREA1323 wurde mit den Plasmiden pKRI22 und pKRI43 transformiert. Die Zellen wurden üN auf LB-Platten kultiviert, geerntet und mit Trypsin oder, als Kontrolle, mit PBS behandelt. Die Produktion und Oberflächenpräsentation der AIDA-I-Fusionsproteine in *S. enterica* serovar *Typhimurium* CREA1323 wurde durch SDS-PAGE (a) und Immunoblot mit einem monoklonalem Antikörper gegen den HA-Tag (b) analysiert.

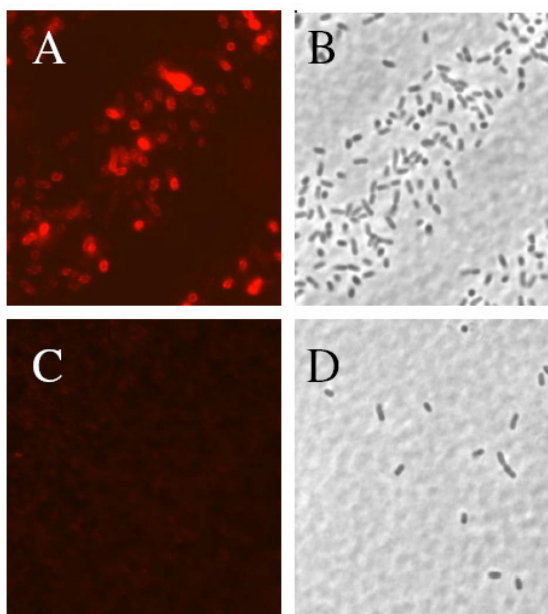


Abb. 30: Oberflächenpräsentation von Hsp60₇₄₋₈₆-HA-CTB-AIDA-I im *S. enterica* serovar *Typhimurium* Impfstamm CREA1323(pKRI43). Indirekte Immunfluoreszenz der *Salmonella*-Stämme CREA1323(pKRI43) (A und B) und CREA1323 (C und D). Physiologisch intakte Zellen wurden mit einem monoklonalem Antikörper gegen das HA-Epitop und mit einem Cy3-konjugierten Ziege anti-Maus sekundären Antikörper gefärbt. Die gefärbten Bakterien wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (A und C) oder Durchlichtmikroskopie (B und D) untersucht.

3.3.1.3 CREA1323(pKRI43) induziert eine T-Zellantwort *in vivo*

Eine *in vivo*-Studie zeigte, dass nach einer Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit CREA1323(pKRI43) antigen-spezifische CD4⁺-T-Zellen isoliert werden konnten, die nach Stimulation mit dem Hsp60₇₄₋₈₆ Epitop proliferierten und IFN- γ sekretierten (Kramer *et al.*, 2003a). Eine Interleukin-4 Produktion der T-Zellen konnte nicht beobachtet werden, was auf eine Induktion vom T_H1-Typ deutet. Die Oberflächenexposition von CD4⁺-T-Zell-Epitopen durch das AIDA-I-Autotransportersystem in *Salmonella*-Vakzinstämmen bewirkt also eine Induktion von bewaffneten CD4⁺-T-Effektorzellen.

3.3.2 Präsentation von cysteinhaltigen Passagierdomänen in *Salmonella*-Impfstämmen

Klauser *et al.* (1990, 1992) zeigten, dass sich die Ausbildung von Disulfidbrücken negativ auf die Translokationskompetenz einer Passagierdomäne durch die Autotransporterdomäne der IgA1-Protease von *Neisseria gonorrhoeae* auswirkt. Durch eine Deletion der periplasmatisch lokalisierten Oxidoreduktase DsbA konnte die Kinetik der Disulfidbrückenbildung jedoch so verändert werden, dass Wildtyp Cholera toxin B, das im Periplasma Disulfidbrücken ausbildet, effizient zur Zelloberfläche von *E. coli* transloziert wurde (Jose *et al.*, 1996). Der Einfluss der Disulfidbrückenbildung von Passagierdomänen auf die Translokation durch den AIDA-I-Autotransporter in *Salmonella*-Vakzinstämmen wurde bisher nicht untersucht. Aus diesem Grund wurde das β GP1 CD8 T-Zellepitop (Paglia *et al.*, 1996) der β -Galactosidase, das ein Cystein enthält, inklusive fünf Aminosäuren N- und C-terminal gewählt. Es sollten Mono-, Di-, Tri- und Tetramere dieses Epitops an die AIDA-I-Autotransporterdomäne fusioniert und die Produktion und Oberflächenpräsentation überprüft werden. Mit den Stämmen, die das CD8-Epitop korrekt präsentierten sollte ein Kooperationspartner in Immunisierungsstudien die Induktion von spezifischen CD8-T-Zellen untersuchen. Die Zusammenarbeit wurde aber leider vorzeitig aufgrund der Insolvenz der CREATOGEN AG beendet, so dass keine *in vivo* Daten erhoben werden konnten.

3.3.2.1 Konstruktion von translationalen Fusionen aus dem β GP1 Epitop und CTB-AIDA-I

Ausgehend vom Plasmid pLAT260 wurde über PCR mit den Oligonukleotidpaar KR38/KRI39 *ha-ctxB-aida-i* amplifiziert, mit *Xba*I/*Nco*I geschnitten und in den ebenso behandelten Vektor pLAT389 subkloniert.

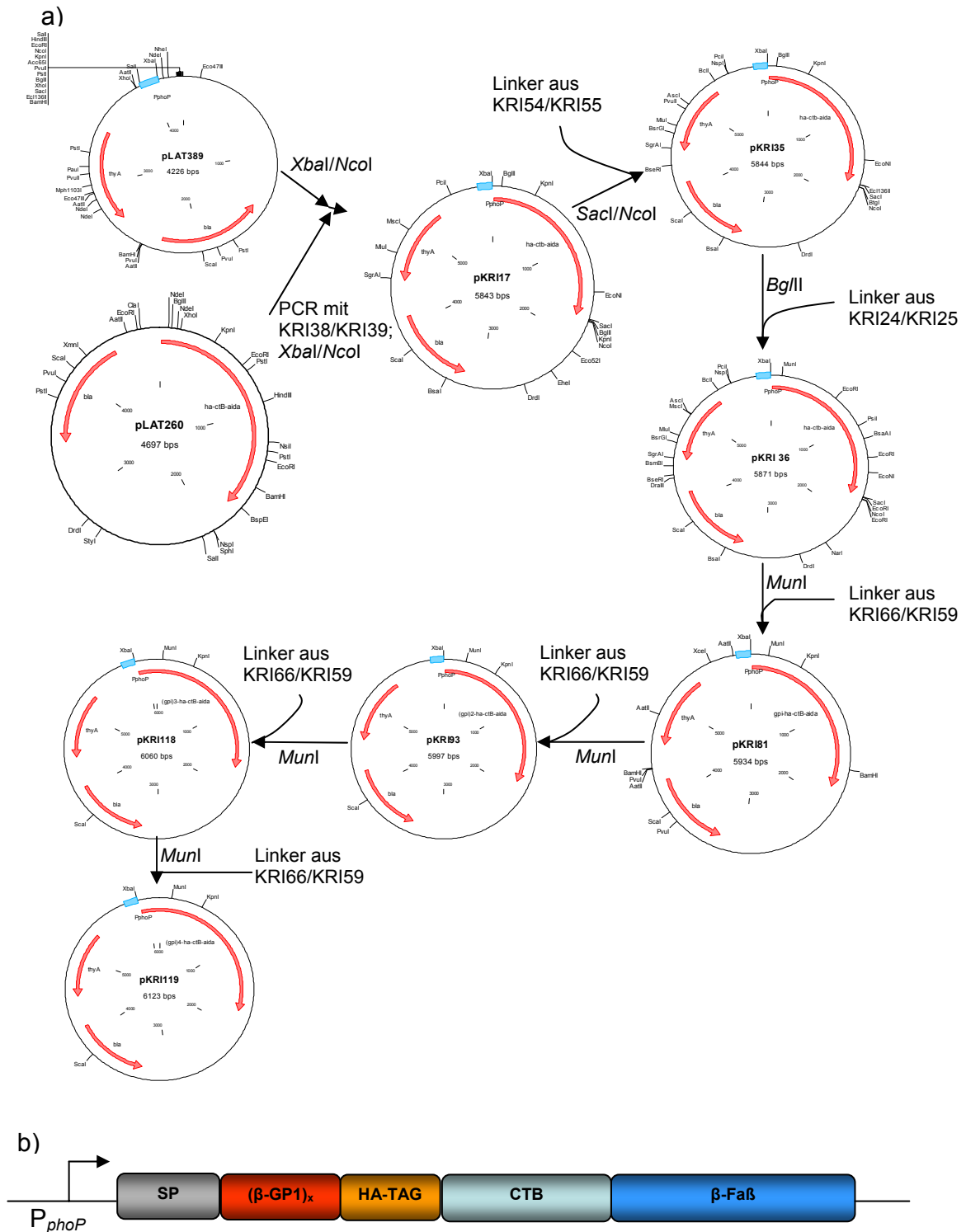


Abb. 31: a) Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für pKRI17, 35, 36, 81, 93, 118, 119. Einzelheiten im Text. B) β -Faß: AIDA-I Autotransporter Translokationseinheit; CTB: modifiziertes Cholera toxin B; HA-Tag: B-Zell-Epitop des Hämagglutinin aus dem humanen Influenzavirus; β GP1 Epitop der β -Galactosidase; SP: Signalpeptid aus Cholera toxin B; $x=1-4$

Das so entstandene Plasmid pKRI17 wurde mit den Restriktionsenzymen *SacI/NcoI* behandelt und ein Linker, entstanden durch Hybridisierung der Oligonukleotide KRI54 und KRI55, eingefügt. Dadurch wurde eine *BglII* und *KpnI* Erkennungssequenz direkt stromabwärts der *aida-i* Sequenz eliminiert und das Plasmid pKRI35 gewonnen. Die Oligonukleotide KRI24/KRI25 wurden hybridisiert und in den mit *BglII* geschnittenen Vektor pKRI35 eingefügt. In die somit zusätzliche geschaffene *MunI* Schnittstelle, die stromaufwärts von der HA-codierenden Sequenz und stromabwärts von der Signalpeptid-Sequenz lag, konnte nun der β GP1-codierende Linker aus KRI66/KRI59 kloniert werden. Die Sequenz von KRI66/KRI59 war für die AIDA-I Sequenz codonoptimiert und außerdem so beschaffen, dass bei Insertion die Erkennungssequenz für *MunI* stromabwärts zerstört wurde. Diese Strategie erlaubte eine sukzessive Insertion des β GP1-codierenden Linkers (Abb. 31) (Tab. 8: Übersicht über die generierten Plasmide). Die Synthese der Fusionsproteine wurde durch den in vivo induzierbaren Promotor P_{phoP} gesteuert.

Tab. 8: Übersicht über β GP1-codierenden Plasmide

Plasmid	Anzahl der Epitope
pKRI36	0
pKRI81	1
pKRI93	2
pKRI118	3
pKRI119	4

3.3.2.2 Disulfidbrückenbindungen in der Passagierdomäne verhindern eine effiziente Oberflächenpräsentation

Die hier generierten Plasmide wurden in *E. coli* JK321 (*ompT*, *dsbA*) und UT5600 (*ompT*) etabliert, um den Einfluss des DsbA-Phänotyps auf die Translokation von cysteinhaltigen Passagierdomänen auf die Zelloberfläche zu analysieren. Dazu wurden Zellen mit Trypsin behandelt und die Lysate im Western-Blot untersucht. Wie Abb. 32 verdeutlicht, wurden alle Fusionsproteine im Stamm JK321 problemlos produziert und auf der Oberfläche präsentiert. Im Gegensatz dazu erfolgt keine Präsentation von Di- und Trimeren des β GP1 Epitops auf der Zelloberfläche von UT5600, da die schwach durch den Antikörper gefärbten Proteine die gleiche molekulare Masse besitzen und nicht zugänglich für Trypsin waren. Das Tetramer wurde in nur sehr geringen Mengen gebildet und anscheinend erfolgte eine Prozessierung der Passagierdomäne, da auch das Monomer in verstärktem Maß auftrat. Diese Beobachtung konnte auch im *dsbA*⁺ *Salmonella*-Impfstamm CREA0293 gemacht werden:

das Monomer wurde produziert, aber nicht die Di- und Trimere (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie in UT5600 wurde das Tetramer nur sehr schwach, aber nicht reproduzierbar, synthetisiert.

Es bleibt festzuhalten, dass Passagierdomänen mit mehr als einem Cystein durch den AIDA-I Autotransporter überhaupt nicht oder sehr ineffizient an die Zelloberfläche von *dsbA*-positiven Stämmen von *E. coli* oder *Salmonella* transloziert werden. Eine Ausnahme bildet dabei die β -Lactamase, die zwei Cysteine enthält und im *E. coli* Stamm UT5600 enzymatisch aktiv auf der Zelloberfläche mittels der AIDA-I-Autotransporterdomäne präsentiert werden konnte (Lattemann *et al.*, 2000).

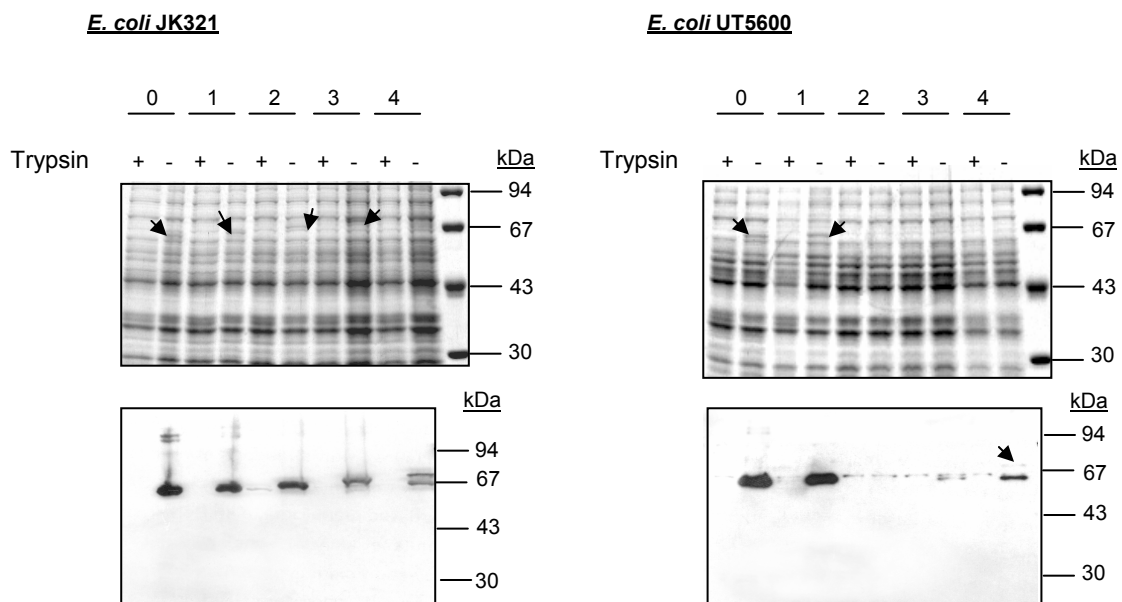


Abb. 32: Synthese und Protease-Zugänglichkeit von AIDA-Fusionsproteinen mit cysteinhaltigen Passagierdomänen in *E. coli*-Stämmen verschiedenen DsbA-Phänotyps. JK321 (*ompT*, *dsbA*) (links) und UT5600 (*ompT*) (rechts) Zellen wurden mit den Plasmiden aus Tab. X transformiert und mit Trypsin oder PBS behandelt. Ganzzelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue G-250 (oben) gefärbt oder durch Western-Blot mit einem monoklonalem Antikörper gegen das HA-Epitop untersucht (unten). Zahlen geben die Menge an CTB-AIDA-I fusionierten β GP1 Epitopen wieder. Pfeilspitzen kennzeichnen die Fusionsproteine.

3.3.3 Autodisplay von UreA-Fragmenten aus *H. pylori* in einem *Salmonella*-Impfstamm

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten ergab sich die Fragestellung, ob das AIDA-I-Präsentationssystem protektive Immunantworten in einem Tiermodell für Infektionskrankheiten induzieren kann, bei dem der Schutz hauptsächlich auf CD4⁺-T-Zellen beruht. Aus diesem Grund wurde das murine *H. pylori*-Infektionsmodell gewählt, da eine protektive Immunität in diesem System primär durch CD4⁺-T-Helferzellen vermittelt wird (Ermak *et al.*, 1998). Ein weiteres Indiz für diese These ist, dass eine Impfung mit rekombinanten *Salmonella*-Stämmen Immunität in IgH^{-/-}-Mäusen hervorrufen konnte, aber nicht in MHCII-defizienten Mäusen (T. Aebischer, persönliche Mitteilung). Zudem Die Produktion der Urease Untereinheiten A und B aus *H. pylori* in attenuierten *Salmonella*-Vakzinstämmen führte nach Immunisierung von Mäusen zu einem hohen Schutz gegen eine Belastungsinfektion mit *H. pylori* (Corthesy-Theulaz *et al.*, 1998; Gomez-Duarte *et al.*, 1998; Londono-Arcila *et al.*, 2002). Drei klinische Phase-I Studien wurden beruhend auf diesem Ansatz durchgeführt (Angelakopoulos und Hohmann, 2000; Bumann *et al.*, 2001c; DiPetrillo *et al.*, 1999). Kürzlich wurden aus Milzen von Mäusen, die mit einem UreA und UreB produzierenden *Salmonella*-Impfstamm immunisiert wurden, oligoklonale CD4⁺-T-Zelllinien isoliert (Lucas *et al.*, 2001). Diese Zelllinien wurden spezifisch durch aufgereinigte Urease A stimuliert und konnten mit verschiedenen aus Urease A abgeleiteten Peptiden (Aminosäuren 27-53, 74-90, 209-225) restimuliert werden (Lucas *et al.*, 2001). Diese Peptide wurden aufgrund ihrer potentiellen Bindung an MHCII-Moleküle vom H-2^d-Haplotyp ausgewählt. Weiterhin konnten die Zelllinien, nach adoptiven Transfer in naive BALB/c Mäuse, einen partiellen Schutz gegen eine Belastungsinfektion mit *H. pylori* bewirken (Lucas *et al.*, 2001). Im folgenden sollte nun untersucht werden, ob die Oberflächenpräsentation von UreA im Tiermodell effizienter als dessen cytoplasmatische Darstellung ist und ob eines der drei Epitope als Fusion mit der AIDA-I-Autoporterdomäne in attenuierten *Salmonella*-Stämmen eine schützende Immunantwort gegen *H. pylori* induzieren kann.

3.3.3.1 Konstruktion der *ureA*₂₇₋₂₃₈-*ha-aida-i* Fusion

Ein *ha-aida-i* enthaltendes DNA-Fragment aus pEGE50 (Claus T. Lattemann, persönliche Mitteilung) wurde über PCR mit KRI64/KRI65 amplifiziert und mit *Xba*I und *Nco*I hydrolisiert, um es in den ebenso vorbereiteten Vektor pLAT389 (s. Kapitel 3.1.1.1) zu transferieren. Eine *Mun*I Schnittstelle stromaufwärts der für das HA-Epitop codierenden Sequenz wurde durch Insertion eines Linkers, entstanden durch Hybridisierung der Oligonukleotide KRI25 und

KRI26, in die *Bgl*II Erkennungssequenz generiert. Das so entstandene Plasmid pKRI77 wurde mit *Bgl*II hydrolysiert. Die *UreA*₂₇₋₂₃₈ Sequenz aus pYZ97 (codiert für Urease A und B Untereinheit)(Gomez-Duarte *et al.*, 1998) wurde mit den Oligonukleotiden LAT68/LAT220 amplifiziert, mit *Bam*HI und *Bgl*II verdaut und in den mit *Bgl*II linearisierten Vektor pKRI77 inseriert. Das so entstandene Plasmid codiert für ein *UreA*₂₇₋₂₃₈-HA-AIDA-I Fusionsprotein, das unter transkriptioneller Kontrolle des *P*_{phoP}-Promotors steht. Die *aida-I* Genfusion aus pKRI77 wurde mit *Xba*I und *Nco*I ausgeschnitten und in das mit *Xba*I/*Nco*I verdaute Plasmid pKRI65 (Konstruktion siehe Kapitel 3.1.1.1) subkloniert. Aus dieser Klonierung ging das Plasmid pKRI143 hervor, das für das AIDA-I Fusionsprotein unter transkriptioneller Kontrolle des *P*_{pagC}-Promotors codiert.

Um *UreA* im Zytoplasma darzustellen, wurde das Plasmid pKRI155 hergestellt. Dazu wurde pEGE63, bei dem die *ureA*-Expression durch den *P*_{TK}-Promotor kontrolliert wird (Claus T. Lattemann, persönliche Mitteilung), mit *Xba*I/*Kpn*I verdaut und das *ureA*-DNA-Fragment in den mit *Xba*I/*Kpn*I behandelten Vektor pKRI65 transferiert.

Zusätzlich wurden Fusionen von *ureA*₂₇₋₅₃, *ureA*₇₄₋₉₀ oder *ureA*₂₀₉₋₂₂₅ mit *ctB-aida-I* hergestellt, deren Expression entweder durch den konstitutiven *P*_{TK}-Promotor oder den *in vivo* induzierbaren Promotor von *pagC* reguliert wird (Claus T. Lattemann, persönliche Mitteilung). Diese Fusionen enthielten kein HA-Epitop.

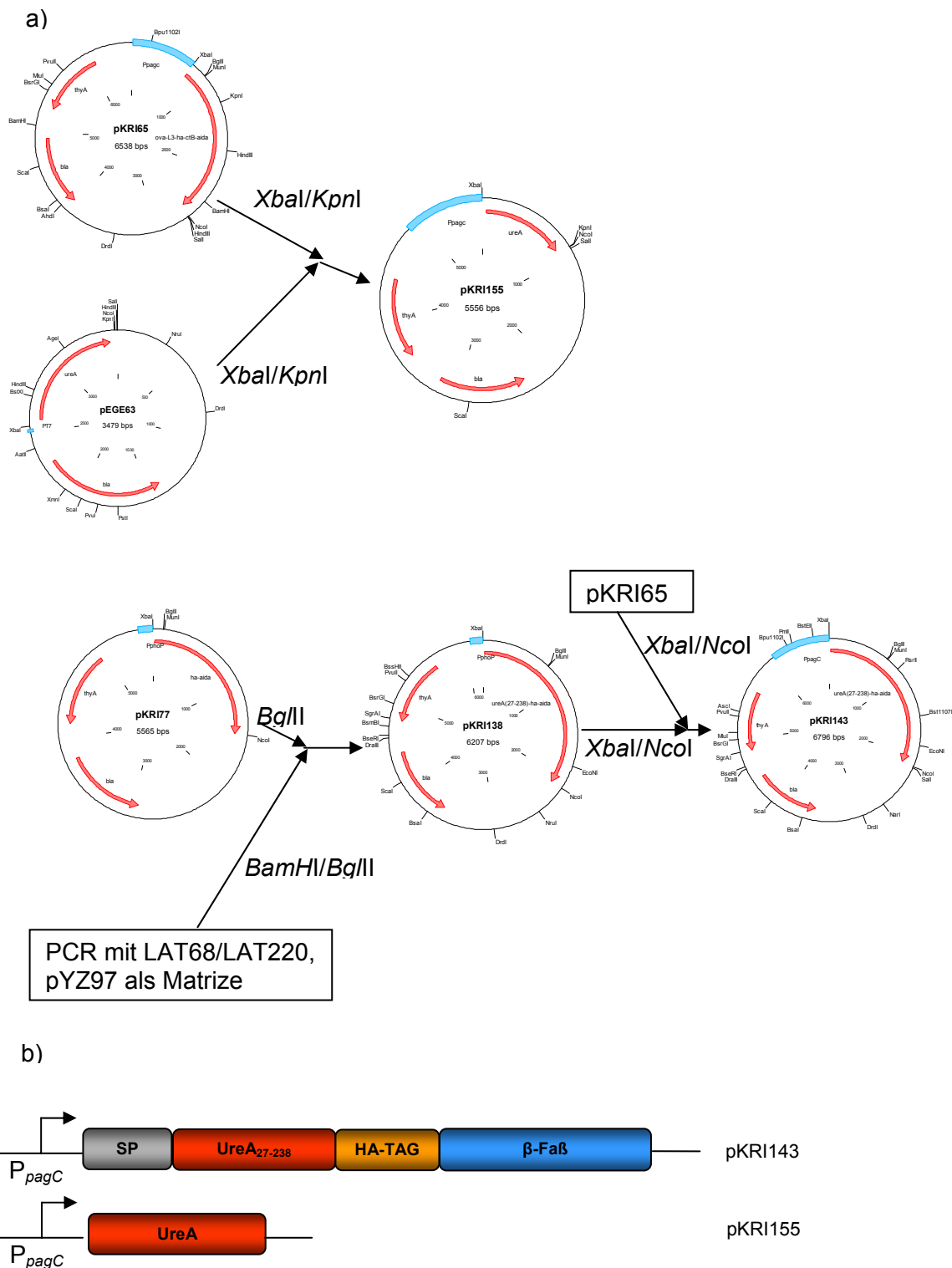


Abb. 33: Schematische Darstellung der Konstruktion von pKRI143 und pKRI155. Klonierungsstrategie (a). β -Faß: AIDA-I-Autotransporter-Translokationseinheit; CTB: modifiziertes Cholera-toxin B; HA-Tag: B-Zell-Epitop des Hämagglutinin aus dem humanen Influenzavirus; SP: Signalpeptid aus Cholera-toxin B; UreA. Urease A-Untereinheit aus *H. pylori*; UreA₂₇₋₂₃₈: Urease A-Fragment (Aminosäuren 27-238)

3.3.3.2 UreA-Fragmente werden auf der Zelloberfläche von *Salmonella*-Impfstämmen präsentiert

Die äußeren Membranen von *Salmonella*-Vakzinstämmen, die AIDA-I Fusionsproteine exprimierten, wurden mit Sarkosylmethode präpariert. Durch anschließende SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen das HA-Epitop oder gegen das Cholera toxin, konnte die Lokalisierung der Fusionsproteine in der äußeren Membran bestätigt werden (Abb. 34). Die Präsentation der UreA-Fragmente auf der Zelloberfläche wurde durch Trypsinierung von intakten *Salmonella* Zellen nachgewiesen (Abb. 35). In Zellysaten von trypsinisierten Zellen konnten Fusionsproteine weder in Coomassie Blue G-250-gefärbten PAA Gelen, noch durch Immunoblot mit α -HA, bzw α -Cholera toxin Antikörpern detektiert werden. Wie aus Abb. 34 und 35 ersichtlich ist, wurde das UreA₂₇₋₂₃₈ HA-AIDA-I Fusionsprotein in geringeren Mengen als HA-AIDA allein gebildet und zusätzlich traten auch Degradationsprodukte auf, die durch eventuelle partielle Proteolyse im Periplasma oder auf der Zelloberfläche zu erklären sind. Die Degradation schien nur den UreA–Teil der Fusion zu betreffen, da die Fragmente durch den HA-Antikörper gebunden werden konnten und mit der äußeren Membran assoziiert blieben.

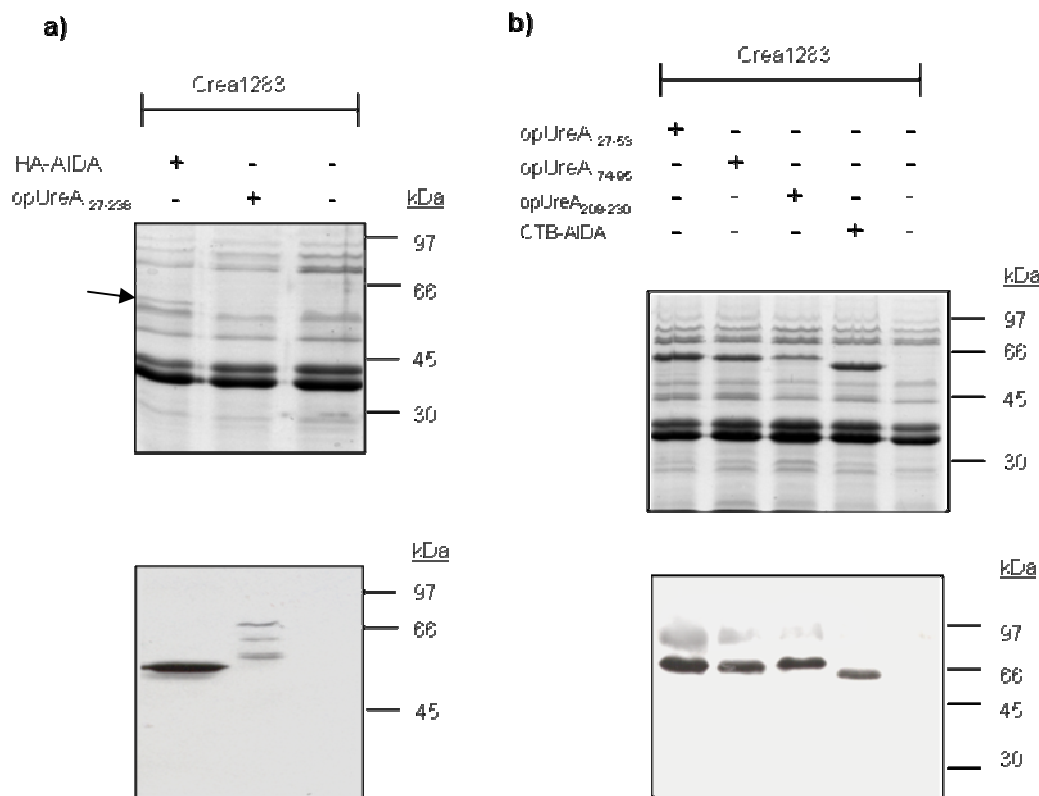


Abb. 34: Lokalisation von AIDA-I Fusionsproteinen in der äußeren Membran von rekombinanten *Salmonella*-Vakzin-Stämmen. Äußere Membranen von *Salmonella*-Impfstämmen wurden präpariert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie Blue G-250 gefärbt (a und b, oben) oder durch Immunoblot mit einem monoklonalem α -HA (a, unten) bzw. polyklonalen α -Cholera toxin Antikörper (b, unten) analysiert. Die Synthese der Fusionsproteine wurde durch P_{phoP} -Promotor (a) oder den konstitutiven P_{TK} Promotor (b) reguliert. Op: Oberflächen-präsentiert

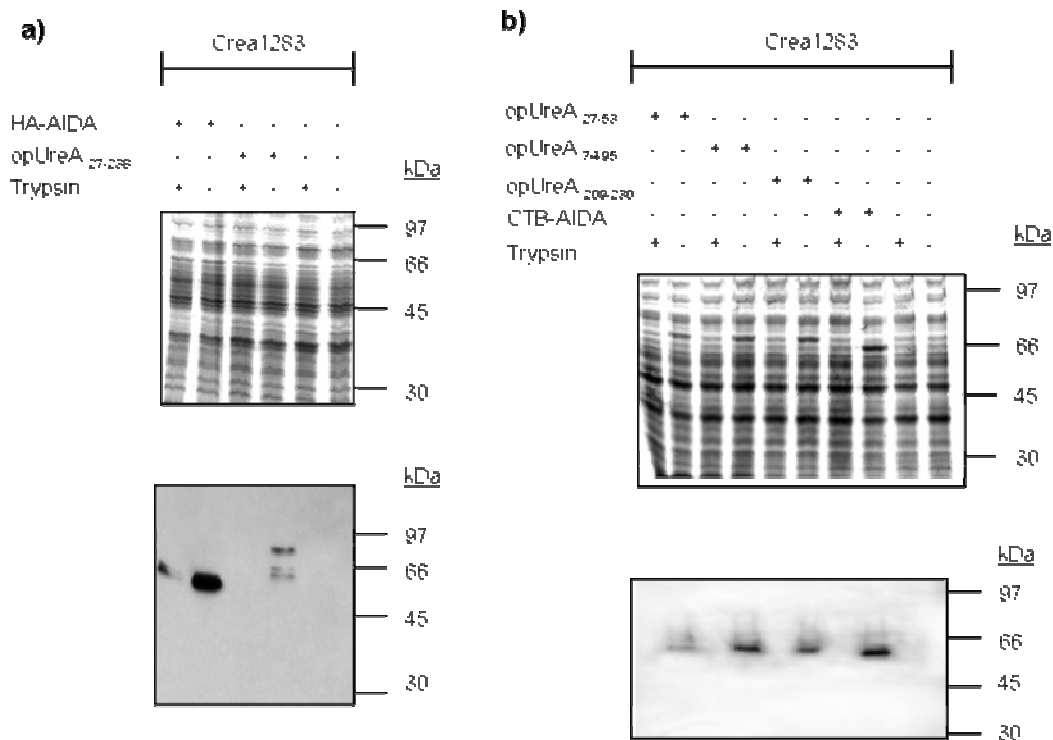


Abb. 35: Protease-Zugänglichkeit von UreA-AIDA-I Fusionsproteinen im *Salmonella*-Stamm CREA1283. Rekombinante *Salmonella*-Stämme wurden entweder mit Trypsin oder PBS behandelt. Ganzzelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue G-250 gefärbt (a und b, oben) oder nach Western-Blot mit einem HA-spezifischen Antikörper (a, unten) bzw. mit einem α -Choleratoxin Serum (b, unten) analysiert. Die Produktion der Fusionsproteine wurde durch den P_{phoP} Promotor (a) oder den konstitutiven P_{TK} Promotor (b) reguliert. Op: Oberflächen-präsentiert

3.3.3.3 Die Oberflächenpräsentation UreA₂₇₋₂₃₈ in einem *Salmonella*-Vakzinstamm schützt Mäuse nach oraler Immunisierung gegen eine *H. pylori* Belastungsinfektion

Die Plasmide pKRI143 und pKRI155 wurden in den *thyA*-deletierten *Salmonella*-Stamm CREA1294 transformiert. Um das Vakzinpotential der Stämme zu eruieren, wurde zuerst die Synthese von UreA in den betreffenden Stämmen unter *in vitro* Bedingungen durch Western-Blot-Analyse mit einem α -*H. pylori* Serum untersucht (Abb. 36). UreA wurde im Cytoplasma [CREA1294(pKRI155)] ein wenig stärker gebildet als auf der Zelloberfläche [CREA1294(pKRI143)]. Als Positivkontrolle wurde der Standard-Vakzinstamm SL3261(pYZ97), der UreA und UreB cytoplasmatisch ausprägt, mitgeführt.

Ein zweiter wichtiger Parameter für Lebend-Vakzin-Stämme ist deren relatives Kolonisierungsvermögen. Zu diesem Zweck wurde je 3 BALB/c Mäuse orogastrisch mit 1×10^9 CFU von CREA1294(pKRI143), CREA1294(pKRI155), SL3261(pYZ97) bzw. dem Parentalstamm CREA1283 orogastrisch immunisiert. Die Kolonisierung in den

immunkompetenten Organen der Tiere wurde an Tag 7 pi bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Kolonisierung in der Regel maximal (Bumann, 2001a).

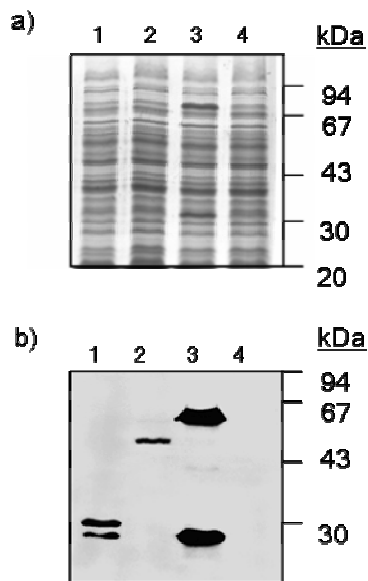


Abb. 36: Syntheseniveaus von UreA in rekombinanten

Salmonella Vakzinstämmen: Die verschiedenen *Salmonella*-Impfstämme wurden auf selektiven LB-Agarplatten gezüchtet und Ganzzellysate von CREA1294(pKRI155) (Spur 1) und CREA1294(pKRI143) (Spur 2), die UreA im Cytosol oder auf der Zelloberfläche ausprägen, wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie Blue G-250-Färbung (a) oder Immunoblot mit einem α -*H. pylori* Serum untersucht. Der Standard Vakzin Stamm SL3261(pYZ97) (Spur 3), der UreA und UreB im Cytoplasma bildet, wurde als Positivkontrolle und der Parentalstamm CREA1283 (Spur 4) als Negativkontrolle verwendet.

Die UreA-produzierenden Stämme CREA1294(pKRI155) und CREA1294(pKRI143) zeigten mit $2.2 \pm 4,3 \times 10^2$ bzw. $3.9 \pm 2.4 \times 10^2$ CFU eine verminderte Kolonisierung der Peyer'schen Plaques am Tag 7 pi im Vergleich zum plasmidlosen Parentalstamm CREA1283 ($6.6 \pm 1.1 \times 10^4$ CFU) und dem Kontrollstamm SL3261(pYZ97) ($7.5 \pm 6.1 \times 10^3$ CFU) (Abb. 37a). Für diese Studie war es entscheidend, dass die UreA produzierenden *Salmonella*-Stämme vergleichbare Synthese- und ähnliche Kolonisierungsniveaus zeigten.

Um die Wirksamkeit gegen eine *H. pylori*-Belastungsinfektion zu testen, wurden die vier Stämme (Parentalstamm Crea1283, SL3261(pYZ97) als Positivkontrolle, CREA1294(pKRI143) und CREA1294(pKRI155)) Mäusen orogastrisch verabreicht (Dosis: 1×10^9 CFU). Vier Wochen nach der Immunisierung erfolgte die orogastrische Infektion mit 1×10^9 CFU *H. pylori*. Drei Wochen nach der Belastungsinfektion wurden die Mäuse getötet und die Besiedlung des Magens mit *H. pylori* bestimmt. Die Vakzinierung mit *Salmonella*-Stämmen, die UreA auf der Zelloberfläche präsentierten, resultierte in einer signifikant erniedrigten *H. pylori*-Besiedlung im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit dem Parentalstamm CREA1283 immunisiert wurde ($P=0.0089$, Student *t* test) (Abb. 37b). Im Gegensatz dazu führte die cytoplasmatische Darstellung von UreA (CREA1294(pKRI155)) zu keiner signifikanten Reduktion der *H. pylori*-Besiedlung im Vergleich zur Negativkontrolle.

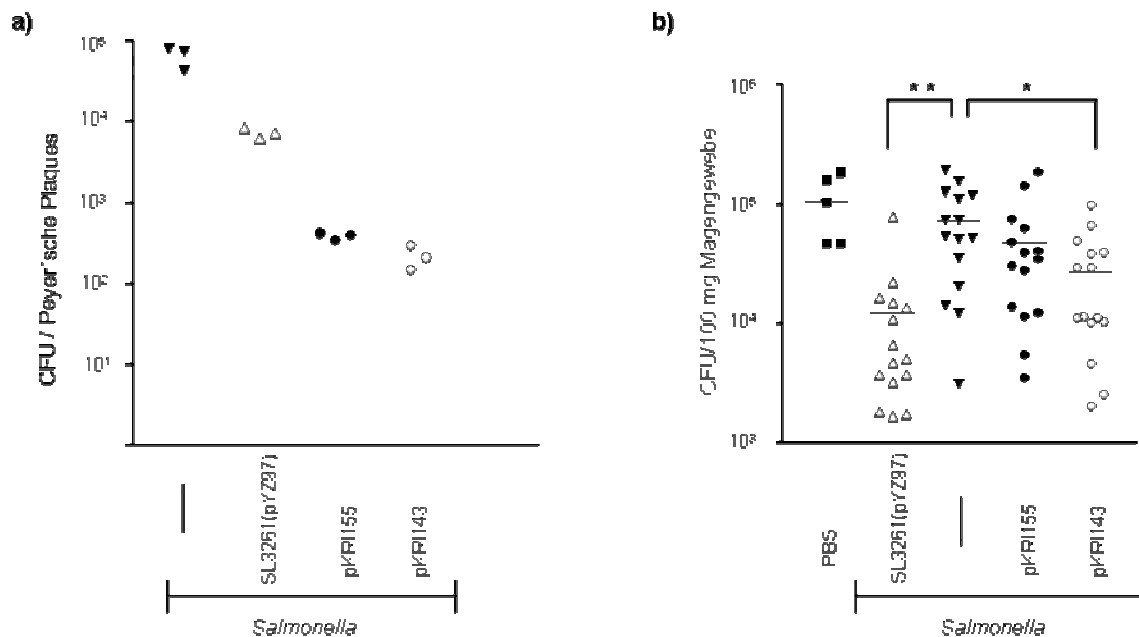


Abb. 37: Kolonisationsvermögen von *Salmonella*-Impfstämmen, die UreA in unterschiedlichen Kompartimenten ausprägen, und Wirksamkeit gegen *H. pylori*.

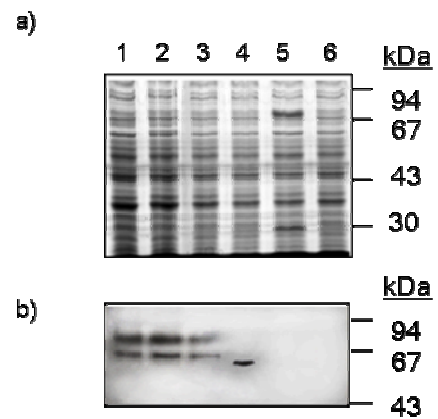
BALB/c Mäuse wurden orogastrisch mit 1×10^9 CFU rekombinanter *Salmonella*-Stämmen CREA1283 (plasmidloser Parentalstamm, —), SL3261(pYZ97), der UreA und B im Cytoplasma ausprägt, CREA1294(pKRI155, UreA im Cytoplasma) oder CREA1294(pKRI143, UreA auf der Zelloberfläche) immunisiert. Nach 7 Tagen pi wurden je drei Mäuse getötet, die Peyer'sche Plaques entfernt, homogenisiert und auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert (a). Alternativ dazu wurden die immunisierten Mäuse vier Wochen nach der Immunisierung mit *H. pylori* infiziert und nach drei Wochen wurde die Besiedlung des Magens durch diesen pathogenen Organismus untersucht (b). Zusammengefaßte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt (n=5 für die mit PBS immunisierte Gruppe, n=15 für CREA1294(pKRI143), CREA1294(pKRI155), CREA1283 und n=14 für SL3261(pYZ97)). Der horizontale Balken repräsentiert den Mittelwert der *H. pylori*-Besiedlung. Statistisch signifikante Unterschiede zur der mit CREA1283 immunisierten Gruppe wurden mit einem ungepaarten Student *t* Test untersucht (*, $P=0,0089$ für CREA1294(pKRI143); **, $P=0,0005$ für die Positivkontrolle SL3261(pYZ97)).

3.3.3.4 Immunisierung mit einem *Salmonella*-Stamm, der ein UreA₂₇₋₅₃-Peptid auf der Zelloberfläche präsentiert, führt zu einer Reduktion der *H. pylori* Last

In der eingangs erwähnten Studie von Lucas *et al.* (2001) wurden drei Peptide des UreA Proteins identifiziert, die von protektiven CD4⁺-T-Zellen erkannt wurden. Hier wurden translationale Fusionen aus den Peptiden und CTB-AIDA-I hergestellt. Plasmide, bei denen die Expression der Fusionen durch den P_{pagC}-Promotor kontrolliert wurde, wurden in CREA1294 transformiert. Die Menge der Fusionsproteine war in etwa identisch, wie durch Immunoblotanalyse mit einem α-Choleratoxin Serum gezeigt wurde (Abb. 38). Bei Western-Blot Untersuchungen mit einem α-*H. pylori* Serum wurden die Fusionsproteine jedoch nicht erkannt (Daten nicht gezeigt).

Abb. 38: Syntheseniveaus von Fusionproteinen aus UreA CD4⁺-T-Zell-Epitopen und CTB-AIDA-I in rekombinanten *Salmonella*-Impfstämmen

Ganzzellsate von rekombinanten *Salmonella*-Stämmen, die auf LB-Agarplatten angezüchtet wurden. 1: CREA1294(opUreA₂₇₋₅₃); 2: CREA1294(opUreA₇₄₋₉₅); 3: CREA1294(op₂₀₉₋₂₃₀); 4: CREA1294(CTB-AIDA-I); 5: SL3261(pYZ97); 6: CREA1283; op: oberflächenpräsentiert. Die Synthese der Fusionsproteine wurde durch den P_{pagC}-Promotor reguliert. (a) Coomassie Blue G-250-gefärbtes PAA Gel. (b) Immunoblot mit einem polyklonalen α-Choleratoxin Serum.



Die verschiedenen *Salmonella*-Vakzinstämme, die unterschiedliche UreA-Peptide auf der Zelloberfläche präsentierten, zeigten in den Peyer'schen Plaques immunisierter Mäuse (Dosis: 1 x 10⁹ CFU)(Abb. 39a) mit ca. 10² CFU pro Stamm ein ähnliches Kolonisierungsniveau im Vergleich zu Stämmen, die UreA entweder im Cytoplasma oder auf der Zelloberfläche darstellten.

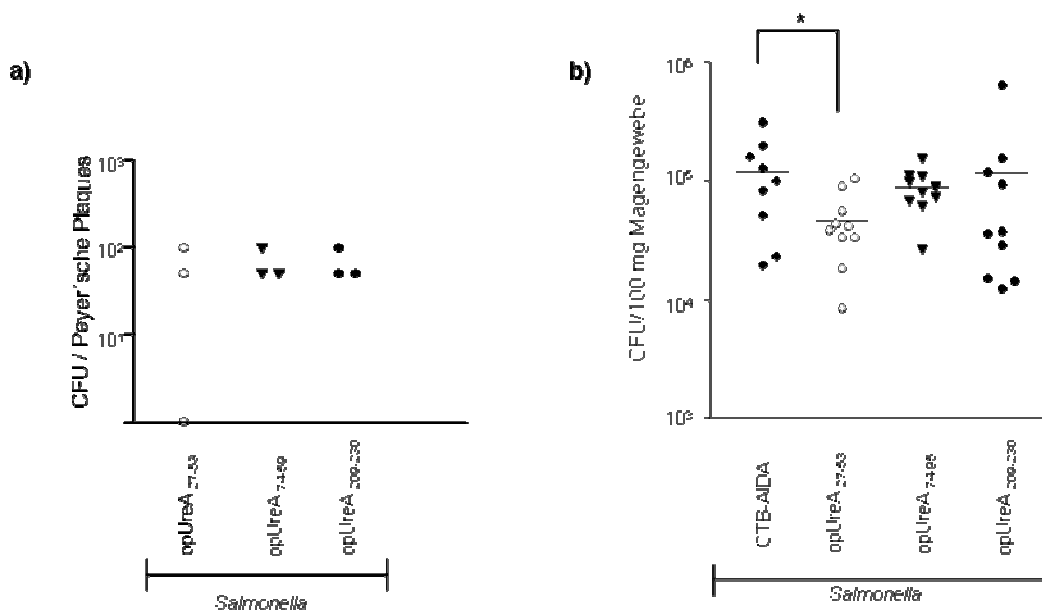


Abb. 39: In vivo-Kolonisierung und Wirksamkeit gegen eine *H. pylori*-Belastungsinfektion von CREA1294 Zellen, die verschiedene UreA-CD4⁺-T-Zell-Epitope auf der Oberfläche präsentieren.

(a) Je 3 Mäuse pro Gruppe wurden mit 1 x 10⁹ CFU rekombinanter *Salmonella*-Stämme orogastrisch immunisiert. Am Tag 7 pi wurden die Mäuse getötet, die Peyer'schen Plaques präpariert, homogenisiert und ausplattiert, um die Kolonisierung durch die Vakzinstämme zu bestimmen. (b) Analyse der *H. pylori*-Last nach Belastungsinfektion von Mäusen, die orogastrisch mit UreA-CD4⁺-T-Zell-Epitop-ausprägenden Vakzinstämmen immunisiert wurden. Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen ist dargestellt (10 Mäuse pro Gruppe). Vakzinierung mit CREA1294 Zellen, die das UreA₂₇₋₅₃-Peptid produzieren, führte zu einer signifikanten Reduktion der *H. pylori*-Besiedlung im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit CREA1294(CTB-AIDA-I) immunisiert wurden (ungepaarter Student t-Test; *, P=0.03; der Mittelwert ist als horizontaler Balken dargestellt). Op: oberflächenpräsentiert

Impfstämme, die Fusionsproteine aus den UreA-Epitopen und CTB-AIDA-I produzierten (kurz: opUreA), wurden für Vakzinierungsstudien eingesetzt. Mäuse wurden mit rekombinanten *Salmonella*-Stämmen, die opUreA₂₇₋₅₃, opUreA₇₄₋₉₅, opUreA₂₀₉₋₂₃₀ oder nur CTB-AIDA-I unter Kontrolle des Promotors P_{pagC} synthetisierten, orogastrisch immunisiert (Dosis: 1 x 10⁹ CFU). Die Belastungsinfektion und Auswertung der Besiedlung des Magens mit *H. pylori* wurde wie in Kapitel 3.3.3.3 beschrieben durchgeführt. Einzig der Stamm, der UreA₂₇₋₅₃ auf der Zelloberfläche präsentierte, führte zu einer signifikanten Reduktion der *H. pylori*-Last im Magen im Vergleich zur Gruppe, die mit der Negativkontrolle geimpft wurde ($P=0,03$, ungepaarter Student *t* Test) (Abb. 39b).

3.4 Antigen Abbau *in vivo* und *in vitro*

Ein weiterer Parameter bei der Charakterisierung von *Salmonella*-Lebendvakzinen ist die Stabilität der heterolog dargestellten Antigene *in vivo*. Diese setzt sich aus Neusynthese und Abbau zusammen. Hier sollte eine Methode entwickelt werden, den reinen Proteinabbau in *Salmonella*-Stämmen zu bestimmen. Zur Etablierung der Methode bietet sich das Modell-Antigen GFP-OVA an, da es *in vivo* und *in vitro* ist durch Durchflußzytometrie technisch einfach zu handhaben. Um den reinen Antigen-Abbau zu messen, sollte die Proteintranslation in *Salmonella* durch Chloramphenicol inhibiert und die Kinetik der Fluoreszenzveränderung bestimmt werden.

GFP-OVA ist ein Derivat des stabilen GFP.mut2 (Cormack *et al.*, 1996), weswegen zuerst der Abbau dieser Variante *in vitro* untersucht wurde. Dazu wurden Kulturen von rekombinanten *Salmonella* SL1344 (Dr. Dirk Bumann, persönliche Mitteilung) aus der exponentiellen Phase in Soja-LB ($OD_{600}=0,6$) mit Chloramphenicol ad $170\mu\text{g/ml}$ supplementiert, zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, mit 2% Formalin fixiert und anschließend die GFP-Fluoreszenz gemessen.

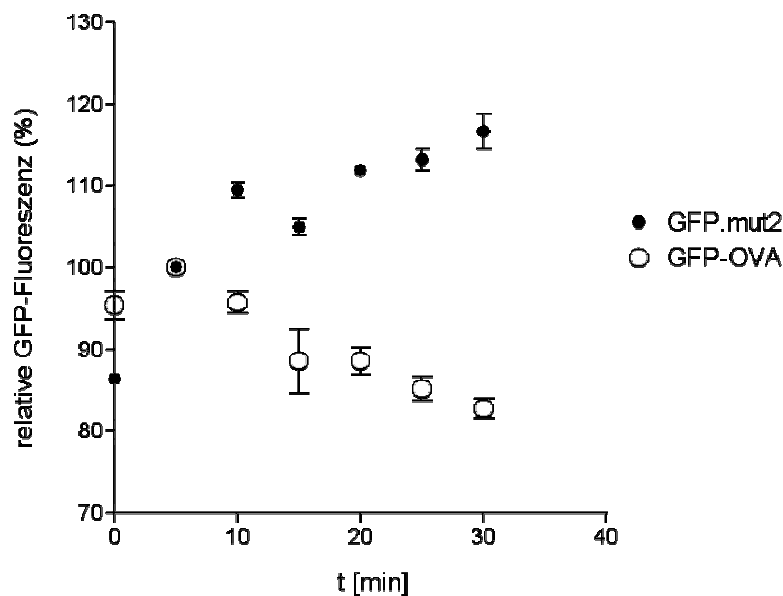


Abb. 40: GFP-Abbau in rekombinanten *Salmonella* während des exponentiellen Wachstums. *Salmonella* SL1344 Stämme, die GFP.mut2 oder GFP-OVA produzierten, wurden in Soja-LB kultiviert. Am nächsten Tag wurde frisches Soja-LB Medium 1:100 inokuliert, die Kulturen bei 37°C bis zu einer $OD_{600}=0.6$ angezogen und mit Chloramphenicol ad $170\mu\text{g/ml}$ supplementiert. Pro Zeitwert und Stamm wurden 3 Ansätze getestet und der Mittelwert der Fluoreszenz berechnet, der Wert zum Zeitpunkt 5 min wurde als 100% relative Fluoreszenz festgelegt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment; die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts.

Eine Abnahme der GFP.mut2-Fluoreszenz wurde während des Meßzeitraums nicht verzeichnet, hingegen konnte eine deutliche Reduktion der GFP-OVA-Fluoreszenz um ca. 15% innerhalb von 30 min beobachtet werden (Abb. 40).

Beiden Meßreihen war gemeinsam, dass in den ersten 5 min nach Chloramphenicol-Zugabe die Fluoreszenz zunahm. Dies ist wahrscheinlich auf die Faltung von synthetisiertem GFP-OVA nach der Inhibition der Proteinsynthese und eventuell auch auf die verzögerte Wirkung des Chloramphenicols zurückzuführen.

Um festzustellen, ob die Fluoreszenzabnahme tatsächlich mit dem Proteinabbau und nicht mit der Denaturierung von GFP-OVA korreliert, wurden Proben aus dem Beginn des Experiments und nach 30 min entnommen, die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mit SDS-Probenpuffer gekocht. Die Zellysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue G-250 gefärbt (Abb. 41).

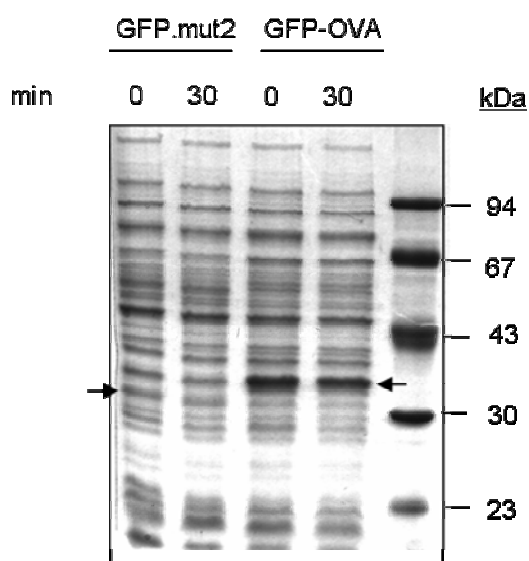


Abb. 41: GFP-Abbau in rekombinanten *Salmonella*-Stämmen während des exponentiellen Wachstums: Zellysate rekombinanter SL1344 *Salmonella*-Stämme aus verschiedenen Zeitpunkten nach Chloramphenicol-Zugabe während des logarithmischen Wachstums wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue G-250 gefärbt. Die GFP-Varianten sind durch Pfeile markiert.

Die Menge an GFP-OVA war 30 min nach Chloramphenicol-Zugabe geringer als zum Zeitpunkt 0 des Experiments. Die Fluoreszenzabnahme korrelierte also mit dem Proteinabbau. Dieses Verfahren sollte nun angewendet werden, um den Abbau von GFP-OVA in infizierten Milzen zu messen. Dazu wurden BALB/c Mäuse mit 10^6 CFU intravenös infiziert und nach 16 h getötet. Die Milz wurde in 1 ml vorgewärmten PBS-Triton X-100 (0,1 % w/v) aufgenommen, homogenisiert und 10 s kräftig gemischt (Vortex), um eukaryotische Zellen zu lysieren. Dem Homogenat wurde anschließend 4 ml vorgewärmtes Soja-LB Medium und Chloramphenicol (Endkonzentration: 170 μ g/ml) zugesetzt, in 5 ml Röhrchen à 200 μ l aliquotiert und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und mit 2% Formalin fixiert. Der Median der Fluoreszenz wurde mit einem Durchflußzytometer ausgewertet.

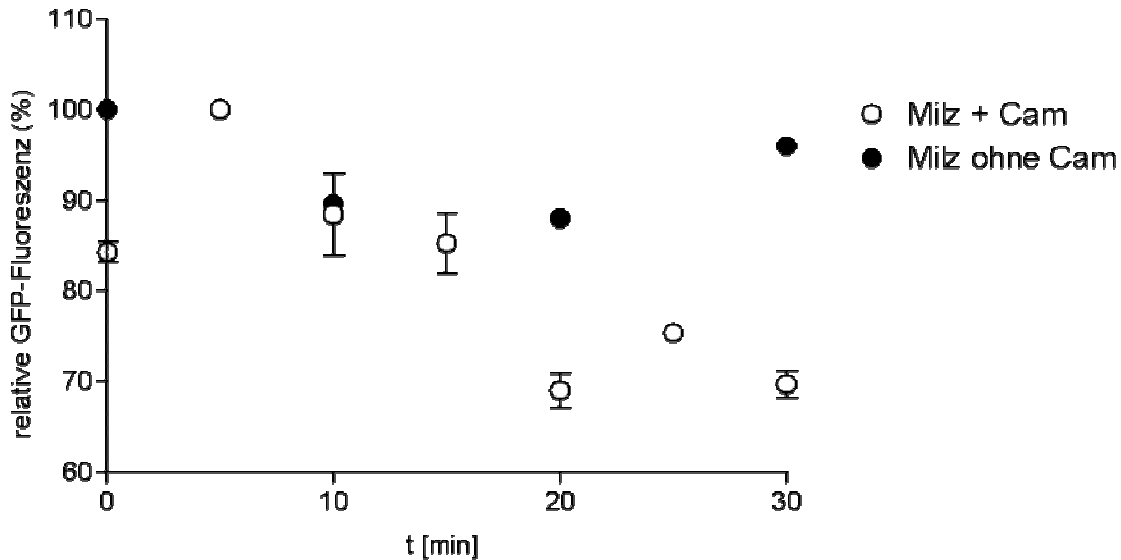


Abb. 42: GFP-OVA Abbau in der Milz. BALB/c Mäuse wurden mit 10^6 CFU rekombinanten Wildtyp-*Salmonella* intravenös infiziert. Nach 16 h wurden die Mäuse getötet, die Milz entnommen und mit vorgewärmten PBS-Triton X-100 (0,1% (w/v)) behandelt. Das Homogenat wurde mit ebenfalls vorgewärmten Soja-LB und Chloramphenicol (170 μ g/ml) versetzt und in 5 ml Röhrchen aliquotiert. Als Kontrolle diente eine Probe ohne Chloramphenicol. Für jeden Zeitpunkt wurden 3 Proben mit FACS analysiert (Kontrolle: nur Einfachbestimmung), gemessen wurde der Median der GFP-Fluoreszenz. Der Wert zum Zeitpunkt 5 min wurde als 100% relative Fluoreszenz festgelegt (Kontrollexperiment: Wert zum Beginn des Experiments). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment; die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts.

Wurde kein Chloramphenicol hinzugefügt, erfolgte keine Abnahme der Fluoreszenz (Abb. 42). Nach Hemmung der Proteinsynthese durch Chloramphenicol erfolgte eine Reduktion der Fluoreszenz um etwa 30% nach 30 min (Abb. 42). Andere Beobachtungen wurden mit den Caecen infizierter Mäuse gemacht. Wurden nämlich Streptomycin vorbehandelte (zum Abtöten der normalen Darmflora) BALB/c Mäuse oral mit einem GFP-OVA ausprägenden *Salmonella*-Stamm infiziert und die Caecen 16 h pi wie beschrieben auf den GFP-OVA Abbau untersucht, konnte keine nennenswerte Abnahme der Fluoreszenz verzeichnet werden (Abb. 43). Somit erfolgt der Antigenabbau je nach besiedeltem Organ mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten.

Interessant wäre es zu wissen, ob oberflächenpräsentierte Antigene anderen Abbaudynamiken unterliegen als cytoplasmatische, wie GFP-OVA, da in den unterschiedlichen zellulären Kompartimenten jeweils unterschiedliche Proteasen den Proteinumsatz steuern. Mit nicht-fluoreszierenden Antigenen ist jedoch der Proteinabbau während der Besiedlung von Organen immunisierter Mäuse durch *Salmonella*-Impfstämme technisch noch nicht möglich. Deshalb sollten im Folgenden die Abbaugeschwindigkeit von OVA-HA-CTB-AIDA-I und GFP-OVA im *Salmonella*-Vakzinestamm CREA1283 während des Wachstums in Kulturmedium (Soja-LB) verglichen werden.

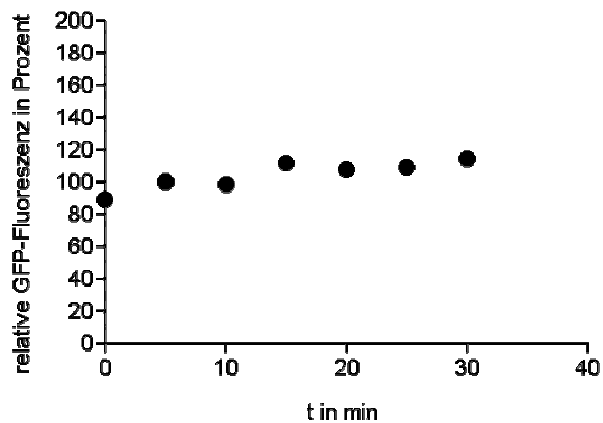


Abb. 43: GFP-OVA Abbau im Caecum. Streptomycin vorbehandelte BALB/c Mäuse wurden orogastrisch mit 10^{10} CFU rekombinanter Wildtyp *Salmonella*-Stämme infiziert. Nach 16 h wurden die Mäuse getötet und das Caecum wie in Abb. 43 beschrieben aufgearbeitet. In dem hier gezeigten repräsentativen Experiment wurde keine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Wert nach 5 min wurde als 100% relative GFP-Fluoreszenz definiert.

Die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase mit Chloramphenicol behandelt und nach unterschiedlichen Zeiten wurden Zellen entnommen und Lysate hergestellt, die einer SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblot analysiert unterzogen wurden. Hierbei ließ sich wieder ein starker Abbau von GFP-OVA registrieren (Abb. 44). Die Menge des Gesamt-AIDA-I Fusionsproteins blieb über den Meßzeitraum konstant, aber ein verkürztes Fragment (ca. 45 kDa) unterlag einer ähnlichen Degradation wie GFP-OVA. Unklar ist die zelluläre Lokalisation dieses Fragments: es könnte cytoplasmatisch vorliegen oder auf der Zelloberfläche und von dort aus in das Kulturmedium diffundieren. Somit kann keine Aussage getroffen werden, ob durch AIDA-I translozierte Passagierdomänen anderen Abbaugeschwindigkeiten unterliegen als cytoplasmatische Antigene.

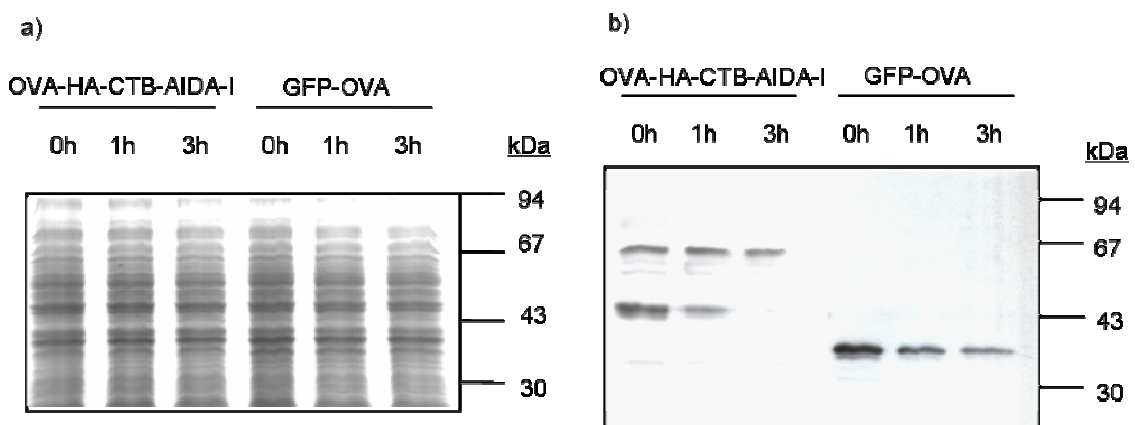


Abb. 44: Vergleich zwischen dem Abbau von OVA-CTB-AIDA-I und GFP-OVA in *Salmonella*-Vakzinstämmen. Der P_{phoP} Promotor regulierte die Synthese der Fusionsproteine im *Salmonella*-Impfstamm CREA1283. Kulturen der Bakterien wurden in Soja-LB bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezchtet. Chloramphenicol wurde ad 170 μ g/ml hinzugegeben und zu bestimmten Zeiten wurden Proben aus den Kulturen entnommen. Zellysate wurden hergestellt und einer SDS-PAGE unterworfen. (a) Coomassie Blue G-250 gefärbtes PAA-Gel. (b) Immunoblot mit einem α -Ovalbuminserum.

4. Diskussion

Impfstoffe gegen Erreger von Infektionskrankheiten sind eine kostengünstige Alternative im Vergleich zur Behandlung mit Antibiotika oder Chemotherapeutika. Der Schutzmechanismus gegen eine Reihe pathogener Mikroorganismen beruht auf der Induktion von protektiven CD4⁺-T-Zellen (Choi *et al.*, 2000; Ermak *et al.*, 1998; Hess *et al.*, 1996; Mastroeni *et al.*, 1992; Noll und Autenrieth, 1996). So wurden z.B. MHCII-bindende Peptide identifiziert, die zumindest einen teilweisen Schutz z.B. gegen *Helicobacter pylori* (Lucas *et al.*, 2001), das Rotavirus (Choi *et al.*, 2000) oder *Yersinia enterocolitica* (Noll und Autenrieth, 1996) vermitteln. Eine CD4⁺-T-Zell-abhängige Immunantwort wird primär dann induziert, wenn exogene Antigene durch Antigen-präsentierende Zellen aufgenommen werden, im Phagosom abgebaut werden und die daraus entstandenen Peptide anschließend naiven T-Zellen präsentiert werden (Germain und Margulies, 1993).

Attenuierte *Salmonella*-Stämme sind geeignete orale Lebendvakzine, um eine mukosale und systemische Immunantwort gegen ein heterologes Antigen herbeizuführen (Garmory *et al.*, 2002; Pasetti *et al.*, 2003). Die bisher durchgeführten Humanstudien zeigen jedoch auf, dass eine Optimierung der eingesetzten Stämme nötig ist. Dies betrifft zum einen die verwendeten *Salmonella*-Vakzinträger (Bumann *et al.*, 2000), als auch die Expressionssysteme zur Darstellung heterologer Antigene (Galen und Levine, 2001). Hinsichtlich der Expressionssysteme herrscht die Meinung, dass die Antigenlokalisierung in *Salmonella*-Vakzinstämmen maßgeblich deren Wirksamkeit beeinträchtigen kann. Einige Studien konnten Hinweise liefern, dass die Zelloberflächenpräsentation oder Sekretion von Antigenen eine bessere humorale Immunantwort bewirkt als deren cytoplasmatische oder periplasmatische Darstellung (Chen und Schifferli, 2000; Haddad *et al.*, 1995; Kang und Curtiss, III, 2003). Für die Induktion der wichtigen CD4⁺-T-Zellantworten liegen jedoch äußerst kontroverse Daten vor.

Eine Studie konnte keinen Lokalisierungseffekt von Antigenen ausmachen (Wick *et al.*, 1994b). Dort wurde ein Modellepitop aus dem Hühnereiweiß-Lysozym an unterschiedliche Positionen von LamB Proteins aus *E. coli* fusioniert, was eine Präsentation des Epitops auf der Zelloberfläche oder im Periplasma von *Salmonella* ergab. Das Gesamtantigen wurde im Cytoplasma dargestellt. Mit den unterschiedlichen Stämmen wurden Makrophagen infiziert, die anschließend mit einem Epitop-spezifischen CD4⁺-T-Zelllinie inkubiert wurden. In allen Ansätzen wurde eine gleichartige Stimulierung der T-Zellen gemessen.

Im Gegensatz dazu stehen die Daten einer anderen Arbeit (Hess *et al.*, 1996a). Dort wurden mit oral applizierten *Salmonella*-Stämmen, die die *Listeria* Antigene Hämolysin oder p60 sekretierten, Schutz gegen eine letale Belastungsinfektion mit *Listeria monocytogenes* erzielt. Die cytoplasmatische Lokalisierung der Antigene erwies sich jedoch als unwirksam.

Nach intravenöser Immunisierung von Mäusen mit den protektiven Stämmen konnten schützende CD4⁺-T-Zellen isoliert werden.

Einige problematische Punkte liegen diesen Daten zu Grunde. Zum einen werden die antigenen Determinanten in einem unterschiedlichen Sequenzkontext präsentiert, da für deren gewünschte Lokalisierung, Fusionen mit Signalpeptiden oder unterschiedlichen Positionen eines Trägerproteins erforderlich sind. Dies kann die Antigenprozessierung und Präsentation differentiell beeinflussen (Moudgil *et al.*, 1998). Janssen *et al.* (1994) konnten dies im Fall eines CD4⁺-T-Zell-Epitops aus dem Hitzeschockprotein Hsp65 von *Mycobacterium tuberculosis* demonstrieren. Dieses Epitop wurde an verschiedene Stellen des PhoE-Proteins aus *E. coli* inseriert. Nur einige Konstrukte konnten jedoch eine T-Zelllinie, die spezifisch für diese antigene Determinante war, stimulieren. Dieser Befund zeigt deutlich die Abhängigkeit der Immunogenität eines Epitops von den flankierenden Regionen. Eine weitere Studie konnte diese Beobachtung bestätigen (Lo-Man *et al.*, 1996). Eine CD4⁺-T-Zell-Epitop-enthaltende Region (Aminosäuren 93 bis 115) des VP1 Proteins vom Poliovirus löst eine Immunantwort in BALB/c Mäusen (H-2^d), aber nicht in SJL/J (H-2^s) Mäusen aus. Wurde dieses Peptid nun an fünf unterschiedliche Positionen innerhalb des MalE-Proteins von *E. coli* fusioniert, induzierten drei dieser Konstrukte eine T-Zellantwort in SJL/J Mäusen. Ein weiteres wichtiges Problem bisheriger Studien ist die initiale Antigenmenge. Meist wurden hohe Dosen von Bakterien verabreicht, die große Antigen-Mengen *in vitro* produzierten (Wick *et al.*, 1994a) (Hess *et al.*, 1996a). Außerdem wurde im Fall der *in vivo* Studie (Hess *et al.*, 1996a) ein Promotor zur Antigensynthese eingesetzt, von dessen Dynamik während des Infektionsprozesses keine Daten vorhanden sind. Im Vergleich zu dieser hohen Antigenmenge wird im weiteren Verlauf der Infektion von einer viel kleineren Zahl von überlebenden Bakterien vermutlich nur ein Bruchteil gebildet, so dass die Gesamt-T-Zell-Antwort durch die frühen Antworten gegen die hohen anfänglichen Antigenmengen im Inokulum dominiert werden (Bumann, 2003), die nicht repräsentativ für Bedingungen sind, die während dem Infektionsprozeß herrschen. Erschwerend kommt hinzu, dass ein Großteil der verabreichten Bakterien am Anfang durch das angeborene Immunsystem abgetötet werden und dadurch Antigene aus allen Kompartimenten der Zelle freigesetzt werden (Buchmeier und Libby, 1997). Dies könnte erklären, warum in der Arbeit von Wick *et al.* (1994) kein Effekt der Antigenlokalisierung in *Salmonella* auf die zelluläre Immunantwort festgestellt werden konnte.

Das *Listeria* Belastungsinfektionsmodell ist für Rückschlüsse auf die Induktion schützender CD4⁺-T-Zellen suboptimal, da der Protektionsmechanismus auf einer komplexen Interaktion verschiedener Zelltypen, u.a. CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, beruht (Shedlock und Shen, 2003). Außerdem wurden die präparierten CD4⁺-T-Zellen, die eine Protektion nach adoptiven Transfer vermittelten, nach einer intravenösen Immunisierung mit rekombinanten

Salmonella-Vazinstämmen generiert (Hess *et al.*, 1996a). Das hat aber keinen Aussagewert über die immunologischen Abläufe nach einer oralen Immunisierung.

Diese verschiedenen Probleme könnten die großen Widersprüche zwischen früheren Studien z.T. erklären. Deswegen war eine grundlegende Arbeit nötig, um den Einfluss der Antigenlokalisierung in *Salmonella*-Vakzinstämmen auf die CD4⁺-T-Zellantwort aufzuklären.

Dafür wurde in dieser Arbeit das OVA-Modellsystem ausgewählt, da dort die entscheidende frühe CD4⁺-T-Zellinduktion analysiert werden kann (Bumann, 2001a). Anschließend sollte ein CD4⁺-T-Zell-Epitop des Hitzeschockproteins Hsp60 aus *Yersinia enterocolitica* in dem optimalen zellulären Kompartiment eines attenuierten *Salmonella*-Stamm präsentiert werden und die Induktion von bewaffneten Effektor CD4⁺-T-Zellen *in vivo* untersucht werden. In einem *Helicobacter pylori*-Infektionsmodell sollte abschließend das Potential des optimalen Kompartiments validiert werden, schützende Immunantworten auszulösen.

4.1 Aufklärung des Einflusses der Antigenlokalisierung in *Salmonella*-Vakzinstämmen auf die frühe CD4⁺-T-Zellantwort durch Verwenden des OVA-Systems

4.1.1 Strategie

Das OVA-Epitop sollte in verschiedenen zellulären Kompartimenten von *Salmonella* dargestellt werden und die Immunantwort im entsprechenden transgenen T-Zell-Rezeptor-System analysiert werden. Dabei wurde eine Vorgehensweise gewählt, um die oben diskutierten, generellen Probleme zu umgehen.

Aufgrund der geringen Konzentration der frühen spezifischen CD4⁺-T-Zellen kann in den konventionellen Tiermodellen der entscheidende Schritt der frühen CD4⁺-T-Zellinduktion nicht quantifiziert werden. Mit transgenen T-Zell-Rezeptor-Modellen ist diese Analyse jedoch möglich (siehe 1.4). Das OVA-System eignet sich dabei am besten, *Salmonella*-Vakzinstämme zu charakterisieren (Bumann, 2003). Aus diesem Grund wurde das OVA-Modellsystem gewählt, um die frühe CD4⁺-T-Zellantwort gegen unterschiedlich lokalisierte Antigene exklusiv bestimmen zu können. Da die Peyer'schen Plaques der Hauptinduktionsort der frühen CD4⁺-T-Zellantwort gegen oral verabreichte *Salmonella*-Lebendimpfstoffe sind (Bumann, 2001a; McSorley *et al.*, 2002), wurde dieses sekundäre lymphatische Organ nach der Verabreichung der unterschiedlichen, OVA-ausprägenden *Salmonella*-Stämme untersucht.

Wie eingangs erwähnt, kann die Sequenzumgebung von Epitopen deren Immunogenität substantiell verändern. Das OVA-Modell-Epitop wird zwar auch in dieser Arbeit in einem unterschiedlichen Sequenzkontext dargestellt und die Untersuchung der Prozessierung und Präsentation von Epitopen während der Immunisierung sind nur schwer zu analysieren. Deshalb wurde alternativer Ansatz gewählt. Für GFP-OVA, dass während der Infektion synthetisiert wird, werden ca. 100.000 Kopien /*Salmonella*-Zelle benötigt, um eine gesättigte CD4⁺-T-Zellantwort zu induzieren. Eine Erhöhung der Antigenmenge bewirkt aber keinen Anstieg der Immunantwort (Dr. Dirk Bumann, persönliche Mitteilung). Der entscheidende Vorteil dieser Arbeit ist, dass mit einer gesättigten T-Zellantwort verglichen werden soll. Diese Antwort stellt eine robuste Referenz dar und es ist unwahrscheinlich, dass durch eine stärkere Synthese oder bessere Prozessierung und Präsentation der anderen Fusionsproteine eine bessere Immunantwort erzielt wird. Eine stärkere T-Zellantwort gegen ein Fusionsprotein würde somit auf einem fundamentalen, qualitativen anstatt eines subtilen, quantitativen Unterschiedes beruhen.

Die initiale Antigenmenge im Inokulum der verabreichten Bakterien kann die gewonnenen Daten verzerren, da die Gesamt-T Zell Antwort, wie erwähnt, durch die frühe T Zellantwort gegen die Antigendosis im Inokulum überlagert werden kann (Bumann, 2003). Somit war es essentiell, die Synthese der Fusionsproteine so zu regulieren, dass erst während der Kolonisierung der Versuchstiere die maximale Synthese der Antigene erfolgt, aber während des Wachstums im Kulturmedium nur eine minimale Antigenmenge produziert wird. Die Lösung des Problems bestand in der Verwendung eines Promotors, der erst während der Infektion induziert wird.

4.1.2 Auswahl der Fusionspartner und Optimierung rekombinanter *Salmonella*-Impfstämme

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der Lokalisation von Antigenen in der *Salmonella*-Zelle auf die frühe CD4⁺-T-Zellantwort in einem transgenen T-Zell Modell (Bumann, 2001a) evaluiert werden. Dazu mussten zuerst geeignete Fusionspartner ausgewählt werden, um das OVA-Modell-Epitop in den gewünschten Kompartimenten zu präsentieren und biochemische Nachweise zur korrekten Lokalisierung mussten geführt werden. Darüber hinaus musste eine ausreichende Kolonisierung der so generierten *Salmonella*-Stämme in den Peyer'schen Plaques gewährleistet sein, um ausreichend starke T-Zellantworten zu erhalten (Bumann, 2001b). Dies wurde durch eine Feinabstimmung der Proteinsynthese der heterologen Antigene erreicht.

4.1.2.1 Präsentation des OVA-Epitops auf der Zelloberfläche durch die AIDA-I-Autotransporterdomäne

Die Tatsache, dass Autotransporter als einzelne Polypeptid-Kette synthetisiert werden, die alle nötigen Informationen enthält, eine N-Terminale Passagierdomäne auf die Zelloberfläche zu translozieren (Jose *et al.*, 1995; Pohlner *et al.*, 1987a), prädestiniert diese Proteinfamilie als Trägersystem zur Oberflächenpräsentation von antigenen Determinanten in attenuierten *Salmonella*-Stämmen. Die Translokationsdomäne des AIDA-I-Autotransporters aus *E. coli* (Benz und Schmidt, 1989) wurde detailliert charakterisiert und N-terminale heterologe Proteine bzw. Proteinfragmente wurden erfolgreich auf der Oberfläche rekombinanter *E. coli*-Zellen präsentiert (Lattemann *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 1997; Maurer *et al.*, 1999) (Konieczny *et al.*, 2000). Nun stellte sich die Frage ob die AIDA-I-Autotransporterdomäne als Trägersystem für die Darstellung von Antigenfragmenten in einem *Salmonella*-Impfstamm geeignet ist. Ruiz-Perez *et al.* (2002) verwendeten die putative Autotransporterdomäne von MisL aus *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, um ein B-Zell-Epitop des Circumsporozoit Proteins aus *Plasmodium falciparum* auf der Zelloberfläche eines *Salmonella*-Vakzin-Stamms zu präsentieren. Um eine messbare humorale Immunantwort *in vivo* zu erzielen, musste viermal immunisiert und Ampicillin in das Trinkwasser der immunisierten Mäuse gegeben werden, was eine Instabilität des Plasmidvektors und schlechte Kolonisierungsfähigkeit des *Salmonella*-Stamms impliziert. Die Applikation von Autotransportern für *Salmonella*-Lebendimpfstoffe könnte somit problematisch sein. Es wurde demonstriert, dass durch die Überproduktion von Proteinen in der äußeren Membran eine DegS-vermittelte periplasmatische Stressantwort ausgelöst werden (Ades *et al.*, 1999; Missiakas *et al.*, 1997). Interessanterweise besitzt die Autotransporterdomäne von MisL und AIDA-I mit der Aminosäuresequenz YSF ein Motiv, das von DegS erkannt werden könnte. Diese Sequenz ist unter normalen Umständen der PDZ-Domäne von DegS nicht zugänglich, wird jedoch erkannt wenn die native Struktur gestört wird (Walsh *et al.*, 2003; Young und Hartl, 2003). Somit könnte durch eine hohe Konzentration von AIDA-I-Fusionsproteinen in der äußeren Membran eine Stressantwort induziert werden, die *Salmonella* in ihrem Kolonisierungsverhalten negativ beeinträchtigen könnte.

In dieser Arbeit musste zuerst evaluiert werden, ob das Ovalbumin-Epitop überhaupt durch die AIDA-I-Autotransporterdomäne effizient auf die Zelloberfläche transloziert werden kann. Außerdem musste geklärt, ob die konstitutive oder *in vivo* induzierte Synthese des Fusionsproteins die Kolonisierungsfähigkeit der *Salmonella*-Stämme gewährleistet. Weitere Feinabstimmungen der Antigensynthese sollte zusätzlich die "fitness" der Impfstämme steigern.

Es konnte erfolgreich eine translationale Fusion des OVA₃₁₉₋₃₄₃-Epitops mit HA-CTB-AIDA-I hergestellt werden. Wie Trypsinierungs-Experimente mit intakten *Salmonella*-Zellen zeigten, wurde das Epitop auf der Zelloberfläche korrekt präsentiert. Die Oberflächenständigkeit des Fusionsproteins wurde weiterhin durch indirekte Immunfluoreszenz bestätigt. Die Synthese des Fusionsproteins wurde durch drei verschiedenen Promotoren im *Salmonella*-Stamm CREA1283 reguliert. Zunächst wurde der konstitutive TK-Promotor (Klauser *et al.*, 1990) getestet. Der daraus resultierende *Salmonella*-Stamm konnte die Peyer'schen Plaques von Mäusen sehr schlecht kolonisieren, was eine frühere Beobachtung hinsichtlich der konstitutiven Produktion von Antigenen bestätigt (Bumann, 2001a). Deshalb wurden die *in vivo* induzierbaren Promotoren P_{phoP} und P_{pagC} verwendet (Dunstan *et al.*, 1999; Hohmann *et al.*, 1995). Die Expression des *phoP*- als auch des *pagC*-Lokus wird durch das Zwei-Komponenten-System PhoP-PhoQ reguliert (Groisman, 2001). Dieses System reagiert auf die extrazytoplasmatische Konzentration an Mg²⁺-Ionen und steuert ein wesentliches Virulenz-Regulon, das Adaption an Mg²⁺-Mangel und weitere Funktionen der Zelle steuert (Groisman, 2001).

Ein Vorteil dieser Promotoren ist, dass sie leicht *in vitro* zu induzieren sind und damit die Kontrolle von Impfstämmen erleichtert. In dieser Arbeit wurde die komplette Promotor-Region von *phoPQ* bzw. der P_{pagC} Promotor verwendet, um die Synthese von OVA-AIDA-I in *Salmonella* zu regulieren.

Um festzustellen, ob die episomal klonierten Promotoren tatsächlich *in vivo* induziert werden, wurde GFP-OVA Reporter-Konstrukte hergestellt. Durchflußzytometrische Analysen zeigten, dass in den Peyer'schen Plaques infizierter Mäuse die Menge an GFP-OVA deutlich höher war als in *in vitro* Kulturen der spät-exponentiellen Phase, was die Funktionalität der klonierten Promotoren bestätigt. Die Antigenproduktion durch den P_{phoP} Promotor bewirkte im Vergleich zum P_{pagC}-Promotor eine 10-fach höhere GFP-OVA-Menge *in vivo*. Eine Regulation durch den P_{pagC}-Promotor führte zu einer sehr geringen Basalproduktion *in vitro*, aber zu einer 50-fachen Induktion *in vivo*. Die P_{phoP}-Regulation führte zu einem 100-mal höheren Synthese *in vitro* (im Vergleich zu P_{pagC}) und zu einer 5-fachen Induktion *in vivo* (10-fache Menge im Vergleich zu P_{pagC}).

Um die Kolonisierungsfähigkeit der OVA-HA-CTB-AIDA-I ausprägenden *Salmonella*-Stämme zu untersuchen, wurden BALB/c Mäuse mit 10¹⁰ CFU rekombinanter *Salmonella*-Stämme infiziert und die Kolonisierung der Peyer'schen Plaques 7 Tage nach der Infektion bestimmt. Dabei zeigten sich dramatische Unterschiede in der Besiedelung: der P_{pagC}-Promotor gewährleistete die beste Kolonisierung mit etwa 10⁴ CFU. Bei Expression durch den P_{phoP} Promotor wurde lediglich ein Niveau von 10² CFU erzielt. Dieser Effekt hängt höchstwahrscheinlich mit der unterschiedlichen Antigenmenge zusammen. Der P_{pagC}-Promotor erwies sich somit als optimaler Promotor. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits

mit der GFP-OVA Synthese in *Salmonella* gemacht (Bumann, 2001b), aber die Unterschiede im Kolonisierungsverhalten waren nicht derart groß, was mit der unterschiedlichen Verträglichkeit der heterologen Proteine für die *Salmonella*-Zelle zu begründen ist. Ausgehend von dieser Hypothese wurde die *in vivo* AIDA-I-Menge mit Hilfe unterschiedlicher Shine-Dalgarno-Sequenzen moduliert. Dadurch wurde ein breites Spektrum an unterschiedlich kolonisierenden *Salmonella*-Stämmen generiert, deren Kolonisierungskapazität den Bereich 10^2 bis 10^5 CFU in den Peyer'schen Plaques infizierter Mäuse umfaßt. Dabei bedingte wie erwartet die stärkste Produktion von OVA-HA-CTB-AIDA-I eine schlechte Kolonisierung und die schwächste Ausprägung die beste Kolonisierung. In dieser Arbeit konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch Modulation der Antigenmenge durch Mutationen in der RBS eine Optimierung der Trägereigenschaften von rekombinanten *Salmonella*-Stämmen erzielt werden kann.

4.1.2.2 Verankerung des OVA-Epitops auf der Periplasma-zugewandten Seite der äußeren Membran in *Salmonella* durch das Braun'sche Lipoprotein

Das Lipoprotein Lpp, das von Braun entdeckt wurde (Braun und Rehn, 1969), stellt mit ca. 2×10^5 Kopien pro Zelle einen der Hauptbestandteile des inneren Teils der äußeren Membran von *E. coli* dar. Die Aufklärung der Kristallstruktur des Braun'sche Lipoproteins (Lpp) ohne N-Terminus und C-terminales Lysin (Shu *et al.*, 2000) zeigte, dass ein großer Bereich des Proteins eine α -helikale Struktur aufweist, die zur Trimerisierung des Lpp beiträgt. Der äußerste C-Terminus (Arginin, Position 57 des reifen Proteins) scheint aber frei zugänglich und Fusionen daran sollten verträglich sein. Diese Strategie würde auch die Expression des Fusionsproteins als Lipoprotein gewährleisten, da der N-Terminus dem des nativen Lpp entspricht und verschiedene Arbeiten gezeigt haben, dass die Signalpeptidsequenz inklusive des stromabwärts gelegene Cystein ausreichen, um ein Protein als Lipoprotein in der äußeren Membran darzustellen (Oudega *et al.*, 1993). Außerdem konnte in einer frühen Studie gezeigt werden, dass Insertionen von Aminosäuren an den N-Terminus (stromabwärts der Signalpeptidsequenz und des Cysteins) toxisch für *E. coli* sind (Inukai *et al.*, 1983). Bisher existierten keine Studien, die Lpp als Fusionspartner für die Expression von Antigenfragmenten oder Proteinen verwendeten. Lediglich die Signalpeptidsequenz und die folgenden 9 Aminosäuren des Lpp wurden benutzt, um Lipidmodifikationen von Proteinen zu erzielen (Andersson *et al.*, 2001) oder als Teil einer Tripelfusion mit einem fünf β -Faltblättern umfassenden Fragment von OmpA (Aminosäuren 46 bis 159), um eine Carboxy-terminal fusionierte β -Lactamase auf der Zelloberfläche von *E. coli* zu präsentieren (Francisco *et al.*, 1992). In dieser Arbeit sollte versucht werden, das OVA-Epitop mit Hilfe

des Lpp an der Innenseite der äußeren Membran zu verankern. Es wurden verschiedene Varianten hergestellt, bei denen OVA-HA sich an unterschiedlichen Positionen von Lpp befindet: Amino- oder Carboxy-terminal oder anstelle des C-terminalen Lysins. Alle Varianten konnten in *Salmonella* synthetisiert werden. Die Fusionsproteine konnten in der äußeren Membran nachgewiesen werden und Trypsinierungsexperimente zeigten, dass alle Varianten korrekt auf der dem Periplasma zugewandten Seite und nicht auf der Zelloberfläche präsentiert wurden. Zudem wurde keine Beeinträchtigung des *in vitro* Wachstums von *Salmonella* durch diese Fusionsproteine beobachtet. Allerdings wurde bei sehr starker Synthese die Integrität der äußeren Membran, laut Versuchen zur SDS-Sensitivität, gestört. Um kovalente Wechselwirkungen mit dem Murein auszuschließen, wurde die Fusion ausgewählt, bei der OVA-HA das C-terminale Lysin ersetzte.

Im Gegensatz zu diesen *in vitro* Daten führte Lpp-OVA Synthese *in vivo* unter Kontrolle des P_{pagC} -Promotors zu einer dramatischen Störung des Kolonisierungsverhaltens. Aus diesem Grund wurde die Menge an Lpp-OVA, analog zu OVA-AIDA, durch verschiedene suboptimale Shine-Dalgarno-Sequenz-Varianten soweit abgeschwächt, bis eine befriedigende Kolonisierungsfähigkeit (ca. 5×10^5 CFU) erreicht wurde.

4.1.2.3 Darstellung des OVA-Epitops im Periplasma durch das Galactose-Bindeprotein MglB

MglB ist das periplasmatische Binde-Protein des ABC-Transportapparats für Galaktose Muller, 1985 MULLER1985 /id}. Die Konzentration von MglB im Periplasma kann 50-mal größer sein als die der Innenmembrankomponenten des ABC-Transportsystems und Werte von etwa 1mM erreichen (Boos und Lucht, 1995). Diese Tatsache ließ MglB als geeigneten periplasmatischen Fusionspartner erscheinen. Die Röntgenstruktur von MglB zeigt, dass der N- als auch der C-Terminus frei vorliegen und somit Fusionen an beiden Termini denkbar wären. Aus klonierungstechnischen Gründen wurde der Amino-Terminus als Fusionstelle benutzt.

In dieser Arbeit wurde eine genetische Fusion aus dem Cholera-toxin B-Signalpeptid, dem OVA-Epitop, dem HA-Epitop und der Sequenz des maturierten MglB hergestellt. Dieses Fusionsprotein wurde in *Salmonella* synthetisiert und befand sich wie erwartet im Periplasma. *In vitro* Versuche zeigten, dass sich eine hohe Konzentration des OVA-HA-MglB Proteins inhibierend auf das Wachstum von *Salmonella* auswirkt. Analog zur Optimierung der AIDA-Konstrukte (s. 4.1.2.1) wurde die Expression von OVA-HA-MglB deshalb mit dem *in vivo* induzierbaren P_{pagC} -Promotor und eine Serie von Shine-Dalgarno-Sequenzen für optimale Kolonisierungskapazität optimiert. Wieder zeigte sich, dass große Antigenmengen

eine schlechte Kolonisierung bewirken (< 100 CFU). Bei abgeschwächter Expression mit suboptimalen Shine-Dalgarno-Sequenzen konnte dagegen eine maximale Kolonisierung von fast 10^5 CFU in den Peyer'schen Plaques erreicht werden.

4.1.2.4 Cytoplasmatische Darstellung des OVA-Epitops durch GFP

Eine Fusion des OVA-Epitops an den Carboxy-Terminus von GFP wurde als cytoplasmatisches Antigen gewählt, da es auch in hohen Mengen (bis 200.000 Kopien pro Zelle) von *Salmonella* gut toleriert wird und die Kolonisierungsfähigkeit nicht beeinträchtigt (Wendland und Bumann, 2002). Außerdem lässt sich die Menge in der *Salmonella*-Zelle während der Infektion durch Durchflußzytometrie quantifizieren (Bumann, 2002).

4.1.3 Antigene in der äußeren Membran induzieren unabhängig ihrer Orientierung eine potente CD4⁺-T-Zellantwort

Um die Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten gegen *Salmonella* zu untersuchen, die das OVA-Epitop in den verschiedenen Kompartimenten präsentieren, wurden die zellulären Immunantworten mit einer gesättigten Immunantwort, die durch eine sättigende Produktion von GFP-OVA hervorgerufen wird, verglichen. Diese Antwort lässt sich auch durch eine vermehrte Synthese von GFP-OVA nicht steigern (Rollenhagen *et al.*, 2004).

Eine niedrige Synthese der Antigene ließ keine wesentlichen Unterschiede in der T-Zellantwort erkennen. Ein erhöhtes Antigenniveau von OVA-MgIB führte zu keiner Steigerung der Immunogenität, ebenso wenig im Fall der cytoplasmatischen Präsentation von GFP-OVA (Dr. Dirk Bumann, persönliche Mitteilung). Wurden die AIDA-I- oder Lpp-Fusionsproteine in höheren Mengen produziert, konnte eine verstärkte Immunantwort verzeichnet werden, die signifikant höher war als bei periplasmatischen oder cytoplasmatischen Antigenen. Dabei war die Immunogenität von OVA-CTB-AIDA-I höher als von Lpp-OVA.

Es konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass hohe Mengen an Antigen in der äußeren Membran eine stärkere CD4⁺-T-Zell-Aktivierung bewirken als periplasmatisch oder cytoplasmatisch lokalisierte Antigene. Erstaunlicherweise scheint dabei die Orientierung innerhalb der äußeren Membran keine Rolle zu spielen. Dies widerspricht der gängigen Meinung, dass eine erhöhte Immunogenität von Antigenen primär durch deren Oberflächenpräsentation oder Sekretion in das Phagoendosom erreichbar ist (Kaufmann und Hess, 1999).

Choleratoxin ist ein äußerst potentes mukosales Adjuvanz und kann die Immunantwort gegen oral verabreichte Antigene beträchtlich steigern (Eriksson und Holmgren, 2002). Ein möglicher Mechanismus könnte die Induktion einer Migration von dendritischen Zellen aus dem sub-epithelialen-Dom der Peyer'schen Plaques in die darunterliegenden B-zellreichen Follikel und benachbarten parafollikulären T-zellreichen Zonen (Shreedhar *et al.*, 2003). Die B-Untereinheit konnte diese Migration nicht auslösen, ist aber doch als zumindest schwaches orales Adjuvanz beschrieben worden (Eriksson und Holmgren, 2002). Im Fall des OVA-HA-CTB-AIDA-I Proteins konnte eine potentielle Adjuvanzfunktion des cysteinlosen CTB-Anteils ausgeschlossen werden: *Salmonella*-Stämme, die entweder GFP-OVA alleine oder in Kombination mit HA-CTB-AIDA-I bildeten, lösten nämlich eine ähnliche CD4⁺-T-Zell-Antwort aus. Die höhere Immunogenität des oberflächenständig präsentierten OVA-Epitops basiert somit auf dessen Lokalisation und nicht auf einem Adjuvanzeffekt durch das fusionierte CTB.

Lpp wurde schon früh als B-Zell-Mitogen beschrieben (Melchers *et al.*, 1975) und man weiß heute, dass bakterielle Lipoproteine durch Bindung an den sogenannten Toll-like-Rezeptor-2 (TLR2) die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und dendritische Zellen, aktivieren kann (Aliprantis *et al.*, 1999; Sieling und Modlin, 2002). Diese Stimulation führt z.B. zur Freisetzung antimikrobieller Peptide oder zur verstärkten Abtötung intrazelluläre Bakterien (Sieling und Modlin, 2002) und ist direkt der Lipidmodifikation zuzuschreiben. Zugleich wird den bakteriellen Lipoproteinen eine Adjuvanz-Wirkung zugeschrieben, die eine Stimulation der adaptiven Immunantwort mit sich führt (Reitermann *et al.*, 1989). Dieser Umstand wird auch bei der Entwicklung von rekombinanten Impfstoffen genutzt und eine große Anzahl lipidmodifizierter Peptide oder Antigenfragmente wurde bisher erfolgreich in Tiermodellen getestet (BenMohamed *et al.*, 2002). *Salmonella* synthetisiert intrinsisch hohe Mengen des Braun'schen Lipoproteins und kann somit den TLR2-Weg des Immunsystems aktivieren. Daher ist es äußerst unwahrscheinlich, dass die hohe Immunogenität von Lpp-OVA auf dem Einfluss des lipidmodifizierten Lpp-Anteils beruht, sondern vielmehr auf der Lokalisation innerhalb der *Salmonella*-Zelle.

Die Kolonisierungskinetik von *Salmonella*-Stämme ist außerdem unabhängig von der Lokalisation der Antigene und zeigt im Fall von GFP-OVA (Bumann, 2001b) sowie OVA-HA-CTB-AIDA-I ausprägenden Stämmen ein Maximum der CFU in den Peyer'schen Plaques am Tag 7 nach der Infektion. Somit scheidet auch eine unterschiedliche Abtötungskinetik der Bakterien durch den infizierten Wirt als Grund für den beobachteten Antigenlokalisierungseffekt aus.

Es konnte demonstriert werden, dass die Antigene der äußeren Membran, aber nicht periplasmatische oder cytoplasmatische, in kleinen Mengen (ca. 0,7% bei Lpp-OVA bzw. ca.

0,3% im Fall von OVA-HA-CTB-AIDA-I) in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt werden. Die entsprechenden Antigene waren durch Ultrazentrifugation sedimentierbar und OmpA (ein Markerprotein für die äußere Membran) konnte ebenfalls in den Sedimenten nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Freisetzung in Form von Vesikeln der äußeren Membran. Die Menge ist relativ klein, erklärt aber andererseits warum relativ hohe Antigenkonzentrationen erforderlich sind, um die beobachtete Erhöhung der Immunogenität zu erzielen. In J-774.A1 Makrophagen (H-2^d), die mit *Salmonella* infiziert waren, konnten LPS-haltige Vesikel detektiert werden, die sich schon 90 min nach der Infektion von lebenden *Salmonella*-Zellen abschnürten und sich in der Wirtszelle verteilten. Dadurch könnten Antigene, die in den Vesikeln der äußeren Membran enthalten sind, Zugang zu zusätzlichen Antigenpräsentations-Wegen erhalten (Abb. 45). Nach der Invasion der Wirtszelle verbleibt *Salmonella* in eine Vakuole (der sogenannten *Salmonella containing vacuole*, SCV), die nicht mit funktionalen Lysosomen fusioniert (Buchmeier und Heffron, 1991; Ishibashi und Arai, 1990; Rathman *et al.*, 1997). Da die SCV's kein oder nur in geringen Mengen Cathepsin D enthalten (Meresse *et al.*, 1999), ist es möglich, dass *Salmonella*-Antigene, die nur in den SCV's vorkommen, einer Prozessierung und MHCII Beladung schlecht zugänglich sind. Phagozytierte *Salmonella*-Zellen sekretieren Proteine mit Hilfe des Typ III-Sekretionssystems direkt in das Cytosol der Wirtszelle (Waterman und Holden, 2003), aber nicht in das Phagoendosom. Der Grund für die erhöhte Immunogenität von artifiziell durch rekombinante *Salmonella*-Stämme in das Phagosom sekretierten Antigenen (Hess *et al.*, 1996a) ist deshalb immer noch ungeklärt. Die Abschnürung von Vesikeln aus der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien scheint dagegen ein natürlicher, passiver Prozeß zu sein (Beveridge, 1999). Diese Strukturen sind aus Bestandteilen der äußeren Membran und Teilen Periplasmas zusammengesetzt, enthalten aber keine Komponenten der Innenmembran und des Cytoplasmas. Im Prinzip handelt es sich also um kleine Partikel der Zellwand (Beveridge, 1999), die einen Durchmesser von 50-250 nm besitzen und unterschiedliche Funktionen besitzen. Im Fall von natürlich kompetenten *Neisseria* und *Hemophilus spp.* dienen die in großen Mengen produzierten Vesikel zum DNA-Transfer (Dorward *et al.*, 1989). Vesikel, die Zellwand-Hydrolasen und Membranporen-formende Proteine enthalten, können andere Bakterien lysieren (Kadurugamuwa und Beveridge, 1999). Außerdem wurde demonstriert, dass aufgereinigte Vesikel aus *Shigella flexneri in vitro* mit Plasmamembranen von Henleschen Zellen fusionieren können. Das *Helicobacter pylori* Toxin VacA scheint ebenfalls mit Vesikeln der äußeren Membran (OMV) assoziiert zu, die man sowohl im Kulturmedium, als auch in humanen Magenbiopsien nachweisen konnte (Fiocca *et al.*, 1999; Keenan *et al.*, 2000). Für das hitzelabile-Enterotoxin aus *E. coli* (Horstman und Kuehn, 2002), Shiga-Toxin aus *Shigella flexneri* (Kolling und Matthews,

1999) und das Leukotoxin aus *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kato *et al.*, 2002) wurde ebenfalls der OMV vermittelte Transport diskutiert.

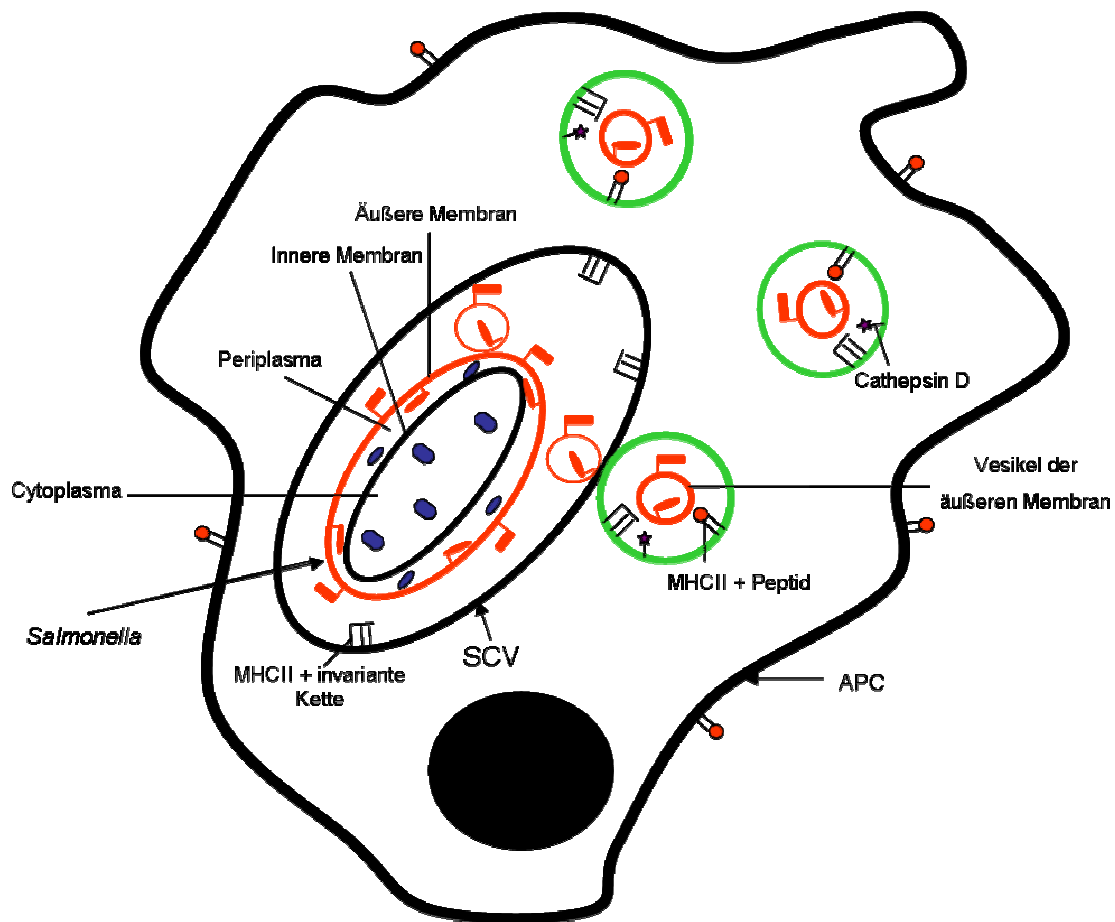


Abb. 45: Hypothetisches Schema der effizienteren Prozessierung von Antigenen in Vesikeln der äußeren Membran von *Salmonella*-Vakzinstämmen. Internalisierte lebende *Salmonella*-Zellen befinden sich in der SCV (*Salmonella containing vacuole*). Dieses von *Salmonella* modifizierte phagolysosomale Kompartiment enthält kein Cathepsin D und dadurch kann die invariante Kette, die MHCII-Moleküle blockiert, nicht hydrolysiert werden. Deshalb können in den SCV's MHCII-Moleküle nur suboptimal beladen werden. Im Gegensatz dazu könnten Antigene in den Vesikeln der äußeren Membran Zugang zu alternativen Prozessierungskompartimenten der APC (*antigen presenting cell*) erhalten und prozessierte Epitope effizienter durch MHCII-Moleküle präsentiert werden. (rot: Antigene und Vesikel der äußeren Membran; blau: periplasmatische und cytoplasmatische Antigene)

Kürzlich konnten Wai *et al.* (2003) zeigen, dass das ClyA Toxin aus *E. coli* erst in OMV oligomerisieren kann und einen aktiven Pore-bildenden Komplex ausbildet. In derselben Arbeit wurde auch beobachtet, dass wohl einige periplasmatische Proteine von OMV ausgeschlossen werden, so wurde die Lactamase in den Vesikeln nachgewiesen, aber nicht die Disulfid:Oxidoreduktase DsbA. In mit *Salmonella* infizierten Epithelzellen konnten kurz nach der Infektion LPS-haltige Vesikel außerhalb der SCV's in der Wirtszelle detektiert werden (Garcia-del Portillo *et al.*, 1997). Wie oben erwähnt konnte dieses Phänomen auch in infizierten Makrophagen beobachtet werden. Dies legt den Schluss nahe, dass in den OMV lokalisierte Antigene eine sehr starke zelluläre Immunantwort auslösen können. Um dies

eindeutig zu belegen, müsste man *Salmonella*-Antigene identifizieren, die in den OMV enthalten sind. Dazu könnte man *Salmonella* unter *in vitro* Bedingungen kultivieren, die das Milieu während der Infektion widerspiegeln. Nach der Isolierung der OMV könnte man dann die Zusammensetzung z.B. durch 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF analysieren und die entsprechenden Komponenten für Immunisierungsstudien verwenden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass hohe Mengen an Proteinen der äußeren Membran, unabhängig ihrer Orientierung, eine eindeutig stärkere CD4⁺-T-Zellantwort induzieren können, als dies mit cytoplasmatischen oder periplasmatischen Antigenen möglich ist. Dieses Ergebnis legt nahe, dass Antigene der äußeren Membran vielversprechende Kandidaten sind, um Impfstoffe für eine zellulär-basierte Immunität zu entwickeln.

Als nächstes sollte nun die wichtige Frage geklärt werden, ob gegen ein heterologes CD4⁺-T-Zell-Epitop, das auf der Zelloberfläche von *Salmonella*-Stämmen lokalisiert ist, auch antigen-spezifische bewaffnete Effektor CD4⁺-T-Zellen *in vivo* induzieren werden können.

4.2 Autodisplay eines des Hsp60₇₄₋₈₆-Epitops aus *Yersinia enterocolitica* in einem *Salmonella*-Vakzinstamms induziert antigenspezifische Effektor CD4⁺-T-Zellen *in vivo*

Die Ergebnisse aus der OVA-Studie zeigen, dass heterologe Antigene in der äußeren Membran von *Salmonella*-Lebendimpfstoffen potente frühe CD4⁺-T-Zellantworten auslösen können. Ob aber Effektor CD4⁺-T-Zellen induziert werden können musste noch analysiert werden. Dies erfolgte nun in einem nicht transgenen Tiermodell.

Die Aminosäuren 74 bis 86 des Hitzeschockproteins Hsp60 aus *Yersinia enterocolitica* wurden als protektives CD4⁺-T-Zell-Epitop gegen dieses Pathogen beschrieben (Noll und Autenrieth, 1996). In dieser Arbeit sollte ein *Salmonella*-Vakzinstamms konstruiert werden, der das Hsp60₇₄₋₈₆ Peptid auf der Zelloberfläche durch die AIDA-I-Autotransporterdomäne präsentiert. Ein Kooperationspartner sollte überprüfen, ob dieser Stamm auch Epitop-spezifische Effektor CD4⁺-T-Zellen *in vivo* induziert kann.

Eine Tripelfusion aus dem Hsp60₇₄₋₈₆ Epitop aus *Yersinia enterocolitica* (Noll und Autenrieth, 1996), einer cysteinlosen Cholera-Toxin B Untereinheit und der Autotransporterdomäne von AIDA-I konnte im *Salmonella*-Vakzinstamm CREA1323 stark produziert werden und wurde in Präparationen der äußeren Membran detektiert. Die Präsentation auf der Zelloberfläche konnte durch Trypsinierung intakter Zellen nachgewiesen werden, da das Fusionsprotein nach Proteasebehandlung nicht mehr nachgewiesen konnte. Durch indirekte

Immunfluoreszenz konnte die Oberflächenpräsentation ebenfalls bestätigt werden. Dieses Expressionssystem war für die Induktion einer zellulären Immunantwort durch attenuierte *Salmonella*-Stämme konstruiert worden. Tatsächlich konnte eine Antigen-spezifische Proliferation von CD4⁺-T-Zellen, die aus immunisierten C57BL/6 Mäusen isoliert wurden (einmalige Dosis von 10¹⁰ CFU CREA1323(pKRI43)), festgestellt werden (Kramer *et al.*, 2003a). Diese Proliferation ging mit einer verstärkten Produktion mit Interferon- γ einher, was auf eine effektive Stimulation durch den eingesetzten Impfstamm hinweist. Jedoch wurde keine Sekretion von IL-4 durch die restimulierten T-Zellen festgestellt. Dies deutet auf eine CD4⁺-T-Zell-Antwort vom T_H1-Typ hin und stimmt mit Beobachtungen überein, die bei Immunisierungen mit attenuierten *Salmonella*-Stämmen, die eine Mutation im *aroA* Locus tragen, gemacht wurden (Dunstan *et al.*, 1998), (Yang *et al.*, 1990). Fremde genetische Elemente, die für heterologe Proteine codieren, verursachen oft eine metabolische Last, die sich durch zusätzliche Attenuation oder einer verminderten Antigen-Expression äußert (Galen und Levine, 2001). Ein Beispiel dafür ist der Verlust von Plasmiden *in vivo*, wenn die heterologe Antigen-Menge zu hoch oder das Antigen toxisch ist. In diesem Fall schien das AIDA-I Fusionsprotein keinen großen toxischen Effekt auf den rekombinanten *Salmonella*-Stamm zu haben, da die Plasmidstabilität nahezu 100% betrug (Kramer *et al.*, 2003b). Die Kolonisierung (ca. 10³ CFU) des Stamms könnte durch die Feinabstimmung der Antigensynthese (siehe 3.1.1.4) noch optimiert werden.

Mit dem AIDA-I-Trägersystem lassen sich also heterologe Antigenfragmente wie das Hsp60₇₄₋₆₈ Epitop aus *Yersinia enterocolitica* stabil und effizient auf der Zelloberfläche von *Salmonella* präsentieren. Zudem wurde eindeutig bewaffnete Effektor CD4⁺-T-Zellen durch einmalige Immunisierung induziert. Gegen Antigen determinanten, die auf die Zelloberfläche attenuierter *Salmonella*-Impfstämme durch die AIDA-I-Autoporterdomäne transloziert werden, kann somit eine wirksame zelluläre Immunantwort *in vivo* hervorgerufen werden.

4.3 Einschränkung des AIDA-I Expressionssystems: Translokation von cysteinhaltigen Passagierdomänen in *Salmonella*-Impfstämmen

Die Ausbildung von stabilen Tertiärstrukturen der Passagierdomäne im Periplasma durch Disulfidbrückenbindung kann sich negativ auf die Translokationskompetenz des Passagiers auswirken (Klauser *et al.*, 1990), (Maurer, 1998). Wurde das Gen für die periplasmatisch lokalisierte Disulfid-Oxidoreduktase DsbA deletiert, die für die Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen verantwortlich ist, konnten translokationsinkompetente Passagierdomänen wie Wildtyp Cholera toxin B, single-chain Antikörper oder PhoA auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Jose *et al.*, 1996), (Maurer, 1998), (Suzuki *et al.*, 1995).

Das cysteinhaltige β GP1-CD8-T-Zell Epitop aus der β -Galactosidase (Paglia *et al.*, 1996) wurde in dieser Arbeit systematisch an HA-CTB-AIDA-I entweder als Mono-, Di-, Tri- oder Tetramer fusioniert. Die heterologen Proteine wurden im *dsbA*⁻ *E. coli* Stamm JK231 alle produziert und Trypsinierungsexperimente bestätigten deren Oberflächenpräsentation. Hingegen inhibierte die Präsenz von DsbA im Parentalstamm UT5600 die Bildung und Translokation der Di- und Trimer-Konstrukte. Das Monomer und in erheblich geringeren Mengen auch das Tetramer-Konstrukt wurden hingegen synthetisiert und auf der Zelloberfläche präsentiert. Untersuchungen zur Produktion und Translokation der β GP1_x-HA-AIDA-I-Fusionsproteine im *Salmonella*-Impfstamm CREA0293 führten zu den gleichen Resultaten, die mit dem *E. coli* Stamm UT5600 erhalten wurden. Die Effizienz der Translokation von Passagierdomänen, die mehr als ein Cystein enthalten, durch den AIDA-I Autotransporteranteil hängt somit maßgeblich vom DsbA Phänotyp der Zelle ab. Dies hat besondere Bedeutung für die Entwicklung von Vakzine-Stämmen, die cysteinhaltige Antigene mittels des AIDA-I Autotransporters präsentieren sollen. Dazu müßten wahrscheinlich die Cysteincodons mutiert werden, um die gewünschte Lokalisation des Antigens in der *Salmonella*-Zelle zu gewährleisten. Alternativ dazu könnte man *dsbA* im *Salmonella* Chromosom deletieren, was aber eventuell zu einer Hyperattenuation führen könnte.

Die MHC I vermittelte zytotoxische CD8⁺-T-Zellantwort gegen das oberflächenpräsentierte Epitop soll in zukünftigen Studien untersucht werden.

4.4 Zum Autodisplay von UreA-Fragmenten aus *H. pylori* in *Salmonella*-Impfstämmen

In einem realen Infektionsmodell sollten nun die Erkenntnisse aus den OVA-Studien validiert werden. Dazu wurde ein System benötigt, bei dem die Schutzwirkung primär durch CD4⁺-T-Zellen vermittelt wird. Das *Helicobacter* Infektionsmodell erfüllt diese Bedingung (Ermak *et al.*, 1998). Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist, dass rekombinante *Salmonella*-Vakzinstämme prinzipiell einen Schutz in immunisierten Mäusen gegen eine Belastungsinfektion mit *Helicobacter* bewirken. So sind *Salmonella*-Stämme protektiv, die die Urease A und B Untereinheiten aus *Helicobacter* synthetisieren (Gomez-Duarte *et al.*, 1998). In dieser Arbeit sollte evaluiert werden, ob das Autodisplay von Urease A mittels des AIDA-I Autotransporters in einem *Salmonella*-Impfstamm der cytoplasmatischen Darstellung von Urease A in Bezug auf eine anti-*Helicobacter* Protektion überlegen ist.

Darüber hinaus sollten UreA-Fragmente, die CD4⁺-T-Zell-Epitope enthalten (Lucas *et al.*, 2001), auf der Zelloberfläche dargestellt werden, um die Möglichkeit einer Vakzinierung mit Epitop-ausprägenden *Salmonella*-Vakzinstämmen gegen *Helicobacter pylori* zu testen.

Eine fast vollständige UreA-Variante (Aminosäuren 27-238) konnte erfolgreich als AIDA-I Fusionsprotein exprimiert und auf der Zelloberfläche von attenuierten *Salmonella*-Stämmen präsentiert werden. Die N-terminalen Aminosäuren 1-26 der UreA-Untereinheit wurden nicht mit einbezogen, da dort 6 Lysinreste vorhanden sind, die aufgrund ihrer Ladung die Translokation über die innere Membran durch den Sec pathway inhibieren könnte (Andersson und von Heijne, 1994). Die drei UreA-Fragmente konnten ebenfalls erfolgreich zu Zelloberfläche transloziert werden. Maus-Immunsierungsexperimente mit nachfolgender *Helicobacter* Belastungsinfektion zeigten die Induktion schützender Immunantworten durch AIDA-Fusionen mit dem fast kompletten UreA, sowie dem UreA-Peptid, das die Aminosäuren 27 bis 53 umfaßt. Im Vergleich zu zytoplasmatisch lokalisierten UreA sind beide AIDA-Fusionen signifikant immunogener. Die Resultate zum UreA-Peptid-Konstrukt sind außerdem eine unabhängige Bestätigung für die Gegenwart eines von Lucas *et al.* (2001) vorhergesagten protektiven CD4⁺-T-Zell-Epitopes in UreA. Dieses Epitop ist damit das erste validierte Peptid, das Schutz gegen *Helicobacter* vermittelt.

Diese Studie belegt das große Potential von Oberflächen-Expression von Antigenen mittels AIDA-I für die Verbesserung von *Salmonella*-basierten Lebendimpfstoffen in einem realen Infektionsmodell. Beide AIDA-I-Konstrukte sind allerdings noch suboptimal, da sie nur eine sehr geringe Kolonisierung der Peyer'schen Plaques immunisierter Mäuse ermöglichen (maximal ca. 10³ CFU). Durch Abschwächung der Expression mit Hilfe der Shine-Dalgarno-Sequenz-Varianten (s. oben) konnten kürzlich deutlich verbesserte Stämme generiert werden, die höhere Kolonisierungskapazität und sehr gute Schutzwirkung haben, die den bisherigen Goldstandard eines *Salmonella*-Stamms, der Urease A und B produziert, übertrifft (Juliane Schroeder, pers. Mitteilung). Eine weitere Steigerung der Wirksamkeit könnte durch Fusion zusätzlicher protektiver Epitope aus anderen *Helicobacter*-Antigenen ermöglicht werden.

4.5 Alternative Präsentationssysteme für Antigene in *Salmonella*-Vakzinstämmen

In früheren Studien wurden bereits alternative Ansätze verfolgt, um Oberflächenpräsentation von Antigenfragmenten in *Salmonella*-Impfstämmen zu erzielen. So wurden immunogene Determinanten an *E. coli* Proteine der äußeren Membran fusioniert, wie z.B. OmpA (Haddad *et al.*, 1995), PhoE (Janssen und Tommassen, 1994; Tommassen *et al.*, 1993), LamB (Charbit *et al.*, 1988; Hayes *et al.*, 1991; Leclerc *et al.*, 1989) und die humorale Immunantwort in vakzinierten Mäusen bestimmt. Nachteile dieser Systeme sind die ineffiziente Präsentation (Haddad *et al.*, 1995) und die Größen- und Konformationslimitation

der heterologen Proteinfragmente. So werden nur Fragmente effizient präsentiert, die kleiner als 60 Aminosäuren sind (Cornelis, 2000). Außerdem wurde im Fall von PhoE berichtet, dass die erfolgreiche Insertion von heterologen Peptiden in die extrazelluläre Schleife durch die Sequenz der flankierenden Aminosäuren beeinträchtigt wird (Janssen *et al.*, 1994). Ebenso wurde die hypervariable Domäne von FliC aus *Salmonella*, der Hauptkomponente der Flagellen, durch heterologe Antigenfragmente ersetzt, um so eine Oberflächenpräsentation zu erzielen. Nach parenteraler oder intravenöser Applikation der *Salmonella*-Stämme konnten hohe Antikörpertiter in immunisierten Mäusen beobachtet werden, aber zeigten nach oraler Verabreichung nur eine schwache Immunogenität (De Almeida *et al.*, 1999; Hayes *et al.*, 1991; Janssen und Tommassen, 1994; Leclerc *et al.*, 1989; Newton *et al.*, 1995). Im Fall des Flagellins als Trägerprotein ist dies vermutlich auf die schnelle Repression der Flagellen-Synthese nach Eindringen in die Wirtszellen zu erklären (Eriksson *et al.*, 2003). Des Weiteren wurden Epitope an P87-Fimbrien aus *E. coli* fusioniert und in attenuierten *Salmonella*-Stämmen produziert, was nach oraler Immunisierung zu einer Produktion von spezifischen Antikörpern führte (Chen und Schifferli, 2000). Kürzlich zeigte die Arbeit von Spreng *et al.* (2003), dass die Oberflächenpräsentation von protektiven B- und T-Zell-Epitopen des p60 Proteins von *Listeria monocytogenes* durch das TolC-Protein aus *E. coli* einen Schutz gegen dieses Pathogen nach Immunisierung bewirkte. Diesen Arbeiten ist bis auf wenige Ausnahmen (De Almeida *et al.*, 1999) gemeinsam, dass die Kolonisierung der Peyer'schen Plaques in immunisierten Mäusen durch die rekombinanten *Salmonella*-Stämme nach oraler Immunisierung nicht untersucht wurde, was Rückschlüsse auf die "fitness" der benutzten Stämme *in vivo* erschwert.

Ein Teil des Hepatitis B Oberflächenantigens wurde an das Ice nucleating protein (Inp) aus *Pseudomonas syringae* fusioniert und im *Salmonella enterica* Serovar Typhi-Impfstamm Ty21a produziert (Lee *et al.*, 2000b). Eine Oberflächenpräsentation des Fusionsproteins konnte jedoch nur bei Kultivierung der Bakterien bei 25°C, nicht aber bei 37°C, beobachtet werden. Einige andere Ansätze verfolgten die Sekretion von Antigenen durch *Salmonella*-Vakzinstämme in ihre unmittelbare Umgebung (Galen und Levine, 2001; Hess *et al.*, 1996a) oder in das Cytoplasma der Wirtszelle (Rusmann *et al.*, 1998). Rekombinante *Salmonella*-Impfstämme, die den α -Hämolyisin-Sekretionsapparat *in trans* enthielten, konnten verschiedene Antigene, die das Exportsignal für den Typ I Sekretionsweg an ihrem Carboxy-Terminus enthielten, aus der Zelle sekretieren und zeigten ihre Wirksamkeit in verschiedenen Tiermodellen (Gentschev *et al.*, 2002). Mit Hilfe des Typ III Sekretionssystems, das auf der Pathogenitätsinsel 1 im *Salmonella*-Chromosom codiert ist, gelang es Rusmann *et al.* (1998) MHC I restringierte Epitope fusioniert an den N-Terminus von SptP, einem sekretierten Effektormolekül von *Salmonella*, in die Wirtszellen zu translokieren und so eine protektive Immunantwort gegen das lymphocytäre

Choriomeningitis-Virus zu induzieren. Interessanterweise konnte mit diesem TypIII Sekretionssystem auch große Antigene, die mit dem N-Terminus von YopE, einem sekretierten Virulenzfaktor aus *Yersinia enterocolitica* fusioniert waren, erfolgreich transloziert werden und eine schützende Immunantwort gegen das intrazelluläre Pathogen *Listeria monocytogenes* erzeugen (Russmann *et al.*, 2001) (Igwe *et al.*, 2002). In letzt genannten Arbeiten wurde jedoch nicht die CD4⁺-T-Zellantwort gemessen, sondern die Aktivierung Antigen-spezifischer CD8⁺-T-Zellen. Dieses System scheint somit geeignet für die Induktion cytotoxischer CD8⁺-T-Zellen zu sein, Daten zur Induktion zellulärer CD4⁺-T-Zellen liegen jedoch nicht vor.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Autotransporter eine effiziente Präsentation von antigenen Determinanten auf der Zelloberfläche von *Salmonella*-Impfstämmen ermöglichen und eine humorale (Ruiz-Perez *et al.*, 2002) und zelluläre CD4⁺-T-Zellantwort (Kramer *et al.*, 2003b) *in vivo* hervorrufen können. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch den AIDA-I-Autotransporter präsentierte *Helicobacter*-Antigene protektive Immunantworten induzieren können (Rizos *et al.*, 2003).

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde das theoretische Konzept zur Verbesserung von *Salmonella*-Lebendimpfstoffen für potente CD4⁺-T-Zellantworten mit einem definierten Modellsystem validiert und hat zu einer erfolgreichen Anwendung in einem realen Infektionsmodell geführt. In nachfolgenden Arbeiten ist die Anwendung bei der weiteren Entwicklung eines *Salmonella*-basierten Humanimpfstoffes gegen *Helicobacter pylori* geplant. Darüber hinaus könnte das entdeckte Phänomen der hohen Immunogenität von Proteinen in der äußeren Membran, unabhängig ihrer Orientierung, eine breite Anwendung in der Impfstoffentwicklung gegen viele wichtige intrazelluläre Erreger finden.

5. Zusammenfassung

1. Ein MHCII-restringiertes Modell-Epitop, Aminosäuren 319 bis 343 des Ovalbumin, wurde in verschiedenen Kompartimenten von *Salmonella* synthetisiert. Zur Präsentation auf der Zelloberfläche wurde die AIDA-I-Autotransporterdomäne verwendet. Die Fusion mit dem Braun'schen Lipoprotein führte zu einer Verankerung in der äußeren Membran, wobei das Fusionsprotein dabei zum Periplasma ragt. Das Galaktose-Bindeprotein, MglB, wurde als Träger für die periplasmatische Präsentation eingesetzt. Für die cytoplasmatische Darstellung wurde GFP benutzt.
2. Immunisierungsstudien konnten zeigen, dass eine regulierte Expression der heterologen Antigene durch den P_{pagC} -Promotor zur besten Kolonisierung der rekombinanten, attenuierten *Salmonella*-Stämme führte. Eine weitere Optimierung der Kolonisierung von Peyer'schen Plaques durch rekombinante, attenuierte *Salmonella*-Stämme wurde durch eine Modulation der Antigenmenge durch die Wahl unterschiedlicher Shine-Dalgarno-Sequenzen erzielt. Dabei zeigte sich deutlich, dass eine schwache Expression in einer verbesserten Kolonisierungsfähigkeit resultierte und dass eine starke Ausprägung der Antigene deutlich die Kolonisierungsfähigkeit verschlechterte. Es wurden Stämme hergestellt, die in einer Bandbreite von 0 bis 10^5 CFU die Peyer'schen Plaques besiedeln konnten.
3. Transgene T-Zell-Rezeptor T-Zellen, die einen Komplex aus MHCII und dem Ovalbumin-Epitop erkennen, wurden in naive BALB/c Mäuse adoptiv transferiert. Nach oraler Immunisierung der chimären Mäuse mit rekombinanten *Salmonella*-Stämmen wurde die spezifische T-Zell-Antwort (aktivierte, CD69-ausprägende transgene $CD4^+$ -T-Zellen) am Tag 7 nach der Immunisierung in den Peyer'schen Plaques gemessen. Gleichzeitig wurde die Kolonisierung durch die *Salmonella*-Stämme in den Peyer'schen Plaques bestimmt. Der Quotient aus aktivierten transgenen T-Zellen und CFU wurde als Maß der Immunantwort definiert. Alle Stämme konnten eine spezifische T-Zell-Induktion hervorrufen.
4. Antigene der äußeren Membran (hier: Lpp-OVA und OVA-AIDA-I) lösen in hohen Mengen, unabhängig von ihrer Orientierung, eine stärkere $CD4^+$ -T-Zell-Antwort aus als periplasmatische oder cytoplasmatische Antigene. Die Freisetzung von Antigenen der äußeren Membran, aber nicht von periplasmatischen oder cytoplasmatischen, in den extrazellulären Raum, wurde beobachtet. Wurden Makrophagen in Zellkultur mit *Salmonella* infiziert, konnte 90 min nach der Infektion die Abschnürung und Verbreitung

von LPS-haltigen Vesikeln aus lebenden, intrazellulären *Salmonella*-Zellen beobachtet werden. Die Freisetzung von Vesikeln der äußeren Membran könnte somit der Grund für die stärkere Immunogenität von Proteinen der äußeren Membran sein.

5. Ein MHCII-restringiertes Hsp60₇₄₋₈₆-Epitop aus *Yersinia enterocolitica* wurde erfolgreich durch die AIDA-I-Autotransporterdomäne auf der Zelloberfläche eines *Salmonella*-Vakzinstamms stabil präsentiert. Nach einmaliger oraler Immunisierung von C57BL/6 Mäusen konnte eine starke spezifische CD4⁺-T-Zellantwort vom T_H1-Typ induziert werden.
6. Passagierdomänen, die mehr als ein Cystein enthalten, werden aufgrund der Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen sehr schlecht durch die AIDA-I-Autotransporterdomäne auf die Zelloberfläche von attenuierten *Salmonella*-Stämmen transloziert.
7. Die Urease A-Untereinheit (Aminosäuren 27 bis 238) aus *Helicobacter pylori* wurde korrekt durch den AIDA-I Autotransporter auf der Zelloberfläche von einem attenuierten *Salmonella*-Stamm präsentiert. Zu Vergleichszwecken wurde ein Stamm konstruiert, der cytoplasmatische Urease A synthetisiert. Die Ausprägung beider Antigene wurde durch den in vivo induzierbaren P_{pagC}-Promotor aus *Salmonella* reguliert. Beide Stämme kolonisierten die Peyer'schen Plaques von oral immunisierten BALB/c Mäusen im gleichen Ausmaß und bildeten beide die heterologen Antigene in etwa gleichen Mengen. Trotzdem konnte nur die Immunisierung mit dem *Salmonella*-Stamm, der Urease A auf der Oberfläche präsentierte, einen gewissen Schutz gegen eine Belastungsinfektion mit *Helicobacter pylori* bieten. Autodisplay eines CD4⁺-T-Zell-Epitops (Urease A₂₇₋₅₃) mittels der AIDA-I-Autotransporterdomäne auf der Zelloberfläche eines *Salmonella*-Vakzinstamms führte nach oraler Immunisierung zu einem partiellen Schutz gegen *Helicobacter pylori*. Damit wurde das erste protektive Epitop gegen *Helicobacter pylori* validiert.

6. Abkürzungen

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CFU	engl.: <i>colony forming units</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	engl.: <i>forward-scatter</i>
x g	xfache Erdbeschleunigung
GFP	engl.: <i>green fluorescent protein</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iv	intravenös
LPS	Lipopolysaccharid
kDa	Kilodalton
MHCII	engl.: <i>major histocompatibility complex class II</i>
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAA	Polyacrylamid
PBS	engl.: <i>phosphat-buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
scFv	engl.: <i>single chain fragment of variable region</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	engl.: <i>Sideward Scatter</i>
Strep	Streptomycin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
üN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

7. Literatur

Ades, S.E., Connolly, L.E., Alba, B.M., Gross, CA. (1999). The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev.* 13(18):2449-61.

Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P. und Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science.* 285, 736-739.

Ames, G.F., Prody, C. und Kustu, S. (1984). Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.* 160, 1181-1183.

Andersson, C., Wikman, M., Lovgren-Bengtsson, K., Lunden, A. und Stahl, S. (2001). In vivo and in vitro lipidation of recombinant immunogens for direct iscom incorporation. *J. Immunol. Methods.* 255, 135-148.

Andersson, H. und von Heijne, G. (1994). Membrane protein topology: effects of delta mu H⁺ on the translocation of charged residues explain the 'positive inside' rule. *EMBO J.* 13, 2267-2272.

Angelakopoulos, H. und 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.

Autenrieth, I.B., Tingle, A., Reske-Kunz, A. und Heesemann, J. (1992). T lymphocytes mediate protection against *Yersinia enterocolitica* in mice: characterization of murine T-cell clones specific for *Y. enterocolitica*. *Infect. Immun.* 60, 1140-1149.

Autenrieth, I.B., Beer, M., Hantschmann, P., Preger, S., Vogel, U., Heymer, B. und Heesemann, J. (1993a). The cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in different inbred strains of mice: evidence for an important role of T lymphocytes. *Zentralbl. Bakteriol.* 278, 383-395.

Autenrieth, I.B., Vogel, U., Preger, S., Heymer, B. und Heesemann, J. (1993b). Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in euthymic und T-cell-deficient athymic nude C57BL/6 mice: comparison of time course, histomorphology, and immune response. *Infect. Immun.* 61, 2585-2595.

BenMohamed, L., Wechsler, S.L. und Nesburn, A.B. (2002). Lipopeptide vaccines--yesterday, today, und tomorrow. *Lancet Infect. Dis.* 2, 425-431.

Benz, I. und Schmidt, M.A. (1989). Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57, 1506-1511.

Beveridge, T.J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181, 4725-4733.

Blum, H., Beier, H. und Gross, H. (1987). Improved silver staining method of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8, 93-99

Bosch, V. und Braun, V. (1973). Distribution of murein-lipoprotein between the cytoplasmic and outer membrane of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 34, 307-310.

Braun, V. und Rehn, K. (1969). Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur. J. Biochem.* *10*, 426-438.

Braun, V. und Sieglin, U. (1970). The covalent murein-lipoprotein structure of the *Escherichia coli* cell wall. The attachment site of the lipoprotein on the murein. *Eur. J. Biochem.* *13*, 336-346.

Braun, V. und Wolff, H. (1970). The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* *14*, 387-391.

Buchmeier, N.A. und Heffron, F. (1991). Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* *59*, 2232-2238.

Buchmeier, N.A. und Libby, S.J. (1997). Dynamics of growth and death within a *Salmonella typhimurium* population during infection of macrophages. *Can. J. Microbiol.* *43*, 29-34.

Bumann, D., Hueck, C., Aebischer, T. und Meyer, T.F. (2000). Recombinant live *Salmonella* spp. for human vaccination against heterologous pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *27*, 357-364.

Bumann, D. (2001a). In vivo visualization of bacterial colonization, antigen expression, and specific T-cell induction following oral administration of live recombinant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infect. Immun.* *69*, 4618-4626.

Bumann, D. (2001b). Regulated antigen expression in live recombinant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strongly affects colonization capabilities and specific CD4(+)-T-cell responses. *Infect. Immun.* *69*, 7493-7500.

Bumann, D., Metzger, W.G., Mansouri, E., Palme, O., Wendland, M., Hurwitz, R., Haas, G., Aebischer, T., von Specht, B. und Meyer, T.F. (2001c). Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. *Vaccine* *20*, 845-852.

Bumann, D. (2002). Examination of *Salmonella* gene expression in an infected mammalian host using the green fluorescent protein and two-colour flow cytometry. *Mol. Microbiol.* *43*, 1269-1283.

Bumann, D. (2003). T cell receptor-transgenic mouse models for studying cellular immune responses to *Salmonella* in vivo. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *37*, 105-109.

Chakravorty, D., Hansen-Wester, I. und Hensel, M. (2002). *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J. Exp. Med.* *195*, 1155-1166.

Charbit, A., Molla, A., Saurin, W. und Hofnung, M. (1988). Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of gram-negative bacteria. *Gene* *70*, 181-189.

Chen, H. und Schifferli, D.M. (2000). Mucosal and systemic immune responses to chimeric fimbriae expressed by *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* vaccine strains. *Infect. Immun.* *68*, 3129-3139.

Chen, Z.M. und Jenkins, M.K. (1999). Clonal expansion of antigen-specific CD4 T cells following infection with *Salmonella typhimurium* is similar in susceptible (Itys) and resistant (Ityr) BALB/c mice [In Process Citation]. *Infect. Immun.* *67*, 2025-2029.

- Choi, A.H., Basu, M., McNeal, M.M., Flint, J., VanCott, J.L., Clements, J.D. und Ward, R.L.** (2000). Functional mapping of protective domains and epitopes in the rotavirus VP6 protein. *J. Virol.* *74*, 11574-11580.
- Choi, D.S., Yamada, H., Mizuno, T. und Mizushima, S.** (1986). Trimeric structure and localization of the major lipoprotein in the cell surface of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *261*, 8953-8957.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. und Falkow, S.** (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* *173*, 33-38.
- Cornelis, P.** (2000). Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr. Opin. Biotechnol.* *11*, 450-454.
- Corthesy-Theulaz, I.E., Hopkins, S., Bachmann, D., Saldinger, P.F., Porta, N., Haas, R., Zheng-Xin, Y., Meyer, T.F., Bouzourene, H., Blum, A.L. und Kraehenbuhl, J.P.** (1998). Mice are protected from *Helicobacter pylori* infection by nasal immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* phoPc expressing urease A und B subunits. *Infect. Immun.* *66*, 581-586.
- Cotter, P.A. und DiRita, V.J.** (2000). BACTERIAL VIRULENCE GENE REGULATION: An evolutionary perspective [In Process Citation]. *Annu. Rev. Microbiol.* *54*, 519-565.
- Datsenko, K.A. und Wanner, B.L.** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 6640-6645.
- De Almeida, M.E., Newton, S.M. und Ferreira, L.C.** (1999). Antibody responses against flagellin in mice orally immunized with attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Arch. Microbiol.* *172*, 102-108.
- DiPetrillo, M.D., Tibbetts, T., Kleanthous, H., Killeen, K.P. und Hohmann, E.L.** (1999). Safety and immunogenicity of phoP/phoQ-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Vaccine* *18*, 449-459.
- Dorward, D.W., Garon, C.F. und Judd, R.C.** (1989). Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* *171*, 2499-2505.
- Dunstan, S.J., Simmons, C.P. und 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.
- Dunstan, S.J., Simmons, C.P. und Strugnell, R.A.** (1999). Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella enterica* var. *Typhimurium*. *Infect. Immun.* *67*, 5133-5141.
- Dunstan, S.J., Ho, V.A., Duc, C.M., Lanh, M.N., Phuong, C.X., Luxemburger, C., Wain, J., Dudbridge, F., Peacock, C.S., House, D., Parry, C., Hien, T.T., Dougan, G., Farrar, J. und Blackwell, J.M.** (2001). Typhoid fever and genetic polymorphisms at the natural resistance-associated macrophage protein 1. *J. Infect. Dis.* *183*, 1156-1160.
- Eriksson, K. und Holmgren, J.** (2002). Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* *14*, 666-672.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. und Hinton, J.C.** (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* *47*, 103-118.

- Ermak, T.H., Giannasca, P.J., Nichols, R., Myers, G.A., Nedrud, J., Weltzin, R., Lee, C.K., Kleanthous, H. und Monath, T.P.** (1998). Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med* 188, 2277-2288.
- Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T.L. und Solcia, E.** (1999). Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J. Pathol.* 188, 220-226.
- Francisco, J.A., Earhart, C.F. und Georgiou, G.** (1992). Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 2713-2717.
- Galan, J.E.** (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* 20, 263-271.
- Galen, J.E. und Levine, M.M.** (2001). Can a 'flawless' live vector vaccine strain be engineered? *Trends Microbiol.* 9, 372-376.
- Garcia-del Portillo, F., Stein, M.A. und Finlay, B.B.** (1997). Release of lipopolysaccharide from intracellular compartments containing *Salmonella typhimurium* to vesicles of the host epithelial cell. *Infect. Immun.* 65, 24-34.
- Garmory, H.S., Brown, K.A. und Titball, R.W.** (2002). *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 339-353.
- Gentschev, I., Dietrich, G., Spreng, S., Pilgrim, S., Stritzker, J., Kolb-Maurer, A. und Goebel, W.** (2002). Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 577-582.
- Georgiou, G., Stephens, D.L., Stathopoulos, C., Poetschke, H.L., Mendenhall, J. und Earhart, C.F.** (1996). Display of beta-lactamase on the *Escherichia coli* surface: outer membrane phenotypes conferred by Lpp'-OmpA'-beta-lactamase fusions. *Protein Eng* 9, 239-247.
- Germain, R.N. und Margulies, D.H.** (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 403-450.
- Germanier, R. und Fuer, E.** (1975). Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* 131, 553-558.
- Gomez-Duarte, O.G., Lucas, B., Yan, Z.X., Panthel, K., Haas, R. und Meyer, T.F.** (1998). Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single oral dose immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing urease subunits A and B. *Vaccine* 16, 460-471.
- Groisman, E.A.** (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol.* 183, 1835-1842.
- Gutgemann, I., Fahrer, A.M., Altman, J.D., Davis, M.M. und Chien, Y.H.** (1998). Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity.* 8, 667-673.

- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. und Beckwith, J.** (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* *177*, 4121-4130.
- Haddad, D., Liljeqvist, S., Kumar, S., Hansson, M., Stahl, S., Perlmann, H., Perlmann, P. und Berzins, K.** (1995). Surface display compared to periplasmic expression of a malarial antigen in *Salmonella typhimurium* and its implications for immunogenicity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *12*, 175-186.
- Hayashi, S., Chang, S.Y., Chang, S., Giam, C.Z. und Wu, H.C.** (1985). Modification and processing of internalized signal sequences of prolipoprotein in *Escherichia coli* and in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* *260*, 5753-5759.
- Hayes, L.J., Conlan, J.W., Everson, J.S., Ward, M.E. und Clarke, I.N.** (1991). Chlamydia trachomatis major outer membrane protein epitopes expressed as fusions with LamB in an attenuated *aro A* strain of *Salmonella typhimurium*; their application as potential immunogens. *J. Gen. Microbiol.* *137 (Pt 7)*, 1557-1564.
- Henderson, I.R. und Nataro, J.P.** (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect. Immun.* *69*, 1231-1243.
- Hess, J., Gentschev, I., Miko, D., Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W. und Kaufmann, S.H.** (1996a). Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 1458-1463.
- Hess, J., Ladel, C., Miko, D. und Kaufmann, S.H.** (1996b). *Salmonella typhimurium* *aroA*-infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4+ TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. *J Immunol.* *156*, 3321-3326.
- Hirota, Y., Suzuki, H., Nishimura, Y. und Yasuda, S.** (1977). On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a mutant of *E. coli* lacking a murein-lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *74*, 1417-1420.
- Hohmann, E.L., Oletta, C.A., Killeen, K.P. und Miller, S.I.** (1996). *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J. Infect. Dis.* *173*, 1408-1414.
- Hohmann, E.L., Oletta, C.A., Loomis, W.P. und Miller, S.I.** (1995). Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 2904-2908.
- Hoiseth, S.K. und Stocker, B.A.** (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* *291*, 238-239.
- Hone, D.M., Harris, A.M., Chatfield, S., Dougan, G. und Levine, M.M.** (1991). Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* *9*, 810-816.
- Hone, D.M., Tacket, C.O., Harris, A.M., Kay, B., Losonsky, G. und Levine, M.M.** (1992). Evaluation in volunteers of a candidate live oral attenuated *Salmonella typhi* vector vaccine. *J. Clin. Invest* *90*, 412-420.
- Horstman, A.L. und Kuehn, M.J.** (2002). Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J. Biol. Chem.* *277*, 32538-32545.

Hughes, E.A. und Galan, J.E. (2002). Immune response to *Salmonella*: location, location, location? *Immunity*. *16*, 325-328.

Igwe, E.I., Geginat, G. und 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.

Inouye, M., Shaw, J. und Shen, C. (1972). The assembly of a structural lipoprotein in the envelope of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *247*, 8154-8159.

Inukai, M., Masui, Y., Vlasuk, G.P. und Inouye, M. (1983). Effects of inserting eight amino acid residues into the major lipoprotein on its assembly in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *155*, 275-280.

Ishibashi, Y. und Arai, T. (1990). Specific inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages mediated by *Salmonella typhimurium* infection. *FEMS Microbiol. Immunol.* *2*, 35-43.

Janssen, R. und Tommassen, J. (1994). PhoE protein as a carrier for foreign epitopes. *Int. Rev. Immunol.* *11*, 113-121.

Janssen, R., Wauben, M., van der, Z.R., de Gast, M. und Tommassen, J. (1994). Influence of amino acids of a carrier protein flanking an inserted T cell determinant on T cell stimulation. *Int. Immunol.* *6*, 1187-1193.

Jones, B.D., Ghori, N. und Falkow, S. (1994). *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* *180*, 15-23.

Jose, J., Jahng, F. und Meyer, T.F. (1995). Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol. Microbiol.* *18*, 378-380.

Jose, J., Kramer, J., Klauser, T., Pohlner, J. und Meyer, T.F. (1996). Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene* *178*, 107-110.

Kadurugamuwa, J.L. und Beveridge, T.J. (1999). Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria. *Microbiology* *145* (Pt 8), 2051-2060.

Kang, H.Y. und Curtiss, R. III (2003). Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *37*, 99-104.

Kato, S., Kowashi, Y., und Demuth, D.R. (2002). Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb. Pathog.* *32*, 1-13.

Kaufmann, S.H. und Hess, J. (1999). Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. *Immunol. Lett.* *65*, 81-84.

Keenan, J., Day, T., Neal, S., Cook, B., Perez-Perez, G., Allardyce, R. und Bagshaw, P. (2000). A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* *182*, 259-264.

- Kelly, S.M., Bosecker, B.A. und Curtiss, R. III** (1992). Characterization and protective properties of attenuated mutants of *Salmonella choleraesuis*. *Infect. Immun.* *60*, 4881-4890.
- Klauser, T., Pohlner, J. und Meyer, T.F.** (1990). Extracellular transport of cholera toxin B subunit using Neisseria IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *EMBO J.* *9*, 1991-1999.
- Kolling, G.L. und Matthews, K.R.** (1999). Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* *65*, 1843-1848.
- Konieczny, M.P., Suhr, M., Noll, A., Autenrieth, I.B. und Schmidt, M.A.** (2000). Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *27*, 321-332.
- Kramer, U., Rizos, K., Apfel, H., Autenrieth, I.B. und Lattemann, C.T.** (2003). Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains. *Infect. Immun.* *71*, 1944-1952.
- Lalmanach, A.C. und Lantier, F.** (1999). Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection. *Microbes. Infect.* *1*, 719-726.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* *227*: 680-685
- Lattemann, C.T., Maurer, J., Gerland, E. und Meyer, T.F.** (2000). Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J. Bacteriol.* *182*, 3726-3733.
- Leclerc, C., Charbit, A., Molla, A. und Hofnung, M.** (1989). Antibody response to a foreign epitope expressed at the surface of recombinant bacteria: importance of the route of immunization. *Vaccine* *7*, 242-248.
- Lee, J.S., Shin, K.S., Pan, J.G. und Kim, C.J.** (2000). Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. *Nat. Biotechnol.* *18*, 645-648.
- Lee, N. und Inouye, M.** (1974). Outer membrane proteins of *Escherichia coli*: biosynthesis and assembly. *FEBS Lett.* *39*, 167-170.
- Levine, M.M., Tacket, C.O., und Sztein, M.B.** (2001). Host-*Salmonella* interaction: human trials. *Microbes. Infect.* *3*, 1271-1279.
- Lo, W.F., Ong, H., Metcalf, E.S. und Soloski, M.J.** (1999). T cell responses to Gram-negative intracellular bacterial pathogens: a role for CD8+ T cells in immunity to *Salmonella* infection and the involvement of MHC class Ib molecules. *J. Immunol.* *162*, 5398-5406.
- Lo-Man, R., Martineau, P., Manoury-Schwartz, B., Hofnung, M. und Leclerc, C.** (1996). Overcoming the crypticity of a viral T cell determinant by insertion into a chimeric bacterial protein. *Int. Immunol.* *8*, 1245-1255.
- Londono-Arcila, P., Freeman, D., Kleanthous, H., O'Dowd, A.M., Lewis, S., Turner, A.K., Rees, E.L., Tibbitts, T.J., Greenwood, J., Monath, T.P. und Darsley, M.J.** (2002). Attenuated *Salmonella* enterica serovar Typhi expressing urease effectively immunizes mice against *Helicobacter pylori* challenge as part of a heterologous mucosal priming-parenteral boosting vaccination regimen. *Infect. Immun.* *70*, 5096-5106.
- Lucas, B., Bumann, D., Walduck, A., Koesling, J., Develioglu, L., Meyer, T.F. und Aebischer, T.** (2001). Adoptive Transfer of CD4(+) T Cells Specific for Subunit A of

Helicobacter pylori Urease Reduces *H. pylori* Stomach Colonization in Mice in the Absence of Interleukin-4 (IL-4)/IL-13 Receptor Signaling. *Infect. Immun.* **69**, 1714-1721.

Mastroeni, P. und Menager, N. (2003). Development of acquired immunity to *Salmonella*. *J. Med. Microbiol.* **52**, 453-459.

Mastroeni, P., Vazquez-Torres, A., Fang, F.C., Xu, Y., Khan, S., Hormaeche, C.E. und Dougan, G. (2000). Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J. Exp. Med.* **192**, 237-248.

Mastroeni, P., Villarreal-Ramos, B. und Hormaeche, C.E. (1992). Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent *Salmonellae* in mice vaccinated with live attenuated aro- *Salmonella* vaccines. *Microb. Pathog.* **13**, 477-491.

Matsumura, H., Onozuka, K., Terada, Y., Nakano, Y. und Nakano, M. (1990). Effect of murine recombinant interferon-gamma in the protection of mice against *Salmonella*. *Int. J. Immunopharmacol.* **12**, 49-56.

Matsuyama, S., Tajima, T. und Tokuda, H. (1995). A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J.* **14**, 3365-3372.

Matsuyama, S., Yokota, N., und Tokuda, H. (1997). A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **16**, 6947-6955.

Maurer, J., Jose, J. und Meyer, T.F. (1997). Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 794-804.

Maurer, J., Jose, J. und Meyer, T.F. (1999). Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J. Bacteriol.* **181**, 7014-7020.

McSorley, S.J., Asch, S., Costalonga, M., Reinhardt, R.L. und Jenkins, M.K. (2002). Tracking *Salmonella*-specific CD4 T cells in vivo reveals a local mucosal response to a disseminated infection. *Immunity.* **16**, 365-377.

Melchers, F., Braun, V. und Galanos, C. (1975). The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*: a B-lymphocyte mitogen. *J. Exp. Med.* **142**, 473-482.

Meresse, S., Steele-Mortimer, O., Finlay, B.B. und Gorvel, J.P. (1999). The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J.* **18**, 4394-4403.

Missiakas, D., Mayer, M.P., Lemaire, M., Georgopoulos, C. und Raina, S. (1997). Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol.* **1997 Apr**;24(2):355-71

Mittrucker, H.W. und Kaufmann, S.H. (2000a). Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice [see comments]. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 457-463.

Mittrucker, H.W., Raupach, B., Kohler, A. und Kaufmann, S.H. (2000b). Cutting Edge: Role of B Lymphocytes in Protective Immunity Against *Salmonella typhimurium* Infection. *J. Immunol.* **164**, 1648-1652.

- Morona, R., Yeadon, J., Considine, A., Morona, J.K. und Manning, P.A.** (1991). Construction of plasmid vectors with a non-antibiotic selection system based on the *Escherichia coli* thyA⁺ gene: application to cholera vaccine development. *Gene* 107, 139-144.
- Moudgil, K.D., Sercarz, E.E. und Grewal, I.S.** (1998). Modulation of the immunogenicity of antigenic determinants by their flanking residues. *Immunol. Today* 19, 217-220.
- Muller, N., Heine, H.G. und Boos, W.** (1985). Characterization of the *Salmonella typhimurium* mgl operon and its gene products. *J. Bacteriol.* 163, 37-45.
- Murphy, K. M., A. B. Heimberger und D. Y. Loh.** (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD41CD81TCR10 thymocytes *in vivo*. *Science* 250:1720–1723.
- Nauciel, C.** (1990). Role of CD4⁺ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *J. Immunol.* 145, 1265-1269.
- Neurath, M.F., Finotto, S. und Glimcher, L.H.** (2002). The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat. Med.* 8, 567-573.
- Newton, S.M., Jacob, C.O., und Stocker, B.A.** (1989). Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. *Science* 244, 70-72.
- Newton, S.M., Joys, T.M., Anderson, S.A., Kennedy, R.C., Hovi, M.E. und Stocker, B.A.** (1995). Expression and immunogenicity of an 18-residue epitope of HIV1 gp41 inserted in the flagellar protein of a *Salmonella* live vaccine. *Res. Microbiol.* 146, 203-216.
- Noll, A. und Autenrieth, I.B.** (1996). Yersinia-hsp60-reactive T cells are efficiently stimulated by peptides of 12 and 13 amino acid residues in a MHC class II (I-Ab)-restricted manner. *Clin. Exp. Immunol.* 105, 231-237.
- Noll, A. und Autenrieth, I.B.** (1996). Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with Yersinia HSP60 immunostimulating complexes or Yersinia HSP60 plus interleukin-12. *Infect. Immun.* 64, 2955-2961.
- Noll, A., Roggenkamp, A., Heesemann, J. und Autenrieth, I.B.** (1994). Protective role for heat shock protein-reactive alpha beta T cells in murine yersiniosis. *Infect. Immun.* 62, 2784-2791.
- O'Brien, A.D., Scher, I. und Formal, S.B.** (1979). Effect of silica on the innate resistance of inbred mice to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.* 25, 513-520.
- Oudega, B., Clark, D., Stegehuis, F., Majoor, M.J. und Luirink, J.** (1993). A lipoprotein signal peptide plus a cysteine residue at the amino-terminal end of the periplasmic protein beta-lactamase is sufficient for its lipid modification, processing and membrane localization in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 108, 353-359.
- Paglia, P., Chiodoni, C., Rodolfo, M. und Colombo, M.P.** (1996). Murine dendritic cells loaded *in vitro* with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen *in vivo*. *J. Exp. Med.* 183, 317-322.
- Pang, T., Levine, M.M., Ivanoff, B., Wain, J. und Finlay, B.B.** (1998). Typhoid fever--important issues still remain. *Trends Microbiol.* 6, 131-133.
- Pape, K.A., Kearney, E.R., Khoruts, A., Mondino, A., Merica, R., Chen, Z.M., Ingulli, E., White, J., Johnson, J.G. und Jenkins, M.K.** (1997). Use of adoptive transfer of T-cell-

antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo. *Immunol Rev* 156, 67-78.

Pasetti, M.F., Levine, M.M. und Sztein, M.B. (2003). Animal models paving the way for clinical trials of attenuated *Salmonella* enterica serovar Typhi live oral vaccines and live vectors. *Vaccine* 21, 401-418.

Pie, S., Truffa-Bachi, P., Pla, M. und Nauciel, C. (1997). Th1 response in *Salmonella typhimurium*-infected mice with a high or low rate of bacterial clearance. *Infect. Immun.* 65, 4509-4514.

Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. und Meyer, T.F. (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325, 458-462.

Ramarathinam, L., Shaban, R.A., Niesel, D.W. und Klimpel, G.R. (1991). Interferon gamma (IFN-gamma) production by gut-associated lymphoid tissue and spleen following oral *Salmonella typhimurium* challenge. *Microb. Pathog.* 11, 347-356.

Rathman, M., Barker, L.P. und Falkow, S. (1997). The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect. Immun.* 65, 1475-1485.

Reitermann, A., Metzger, J., Wiesmuller, K.H., Jung, G. und Bessler, W.G. (1989). Lipopeptide derivatives of bacterial lipoprotein constitute potent immune adjuvants combined with or covalently coupled to antigen or hapten. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370, 343-352.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P. und Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2, 361-367.

Richarme, G., el Yaagoubi, A. und Kohiyama, M. (1993). The MglA component of the binding protein-dependent galactose transport system of *Salmonella typhimurium* is a galactose-stimulated ATPase. *J. Biol. Chem.* 268, 9473-9477.

Richarme, G. und Kohiyama, M. (1992). Purification of the MglC/E membrane proteins of the binding protein-dependent galactose transport system of *Salmonella typhimurium*. *FEBS Lett.* 304, 167-169.

Richter-Dahlfors, A., Buchan, A.M.J. und Finlay, B.B. (1997). Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 186, 569-580.

Rizos, K., Lattemann, C.T., Bumann, D., Meyer, T.F. und Aebischer, T. (2003). Autodisplay: Efficacious Surface Exposure of Antigenic UreA Fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* Vaccine Strains. *Infect. Immun.* 71, 6320-6328.

Ruiz-Perez, F., Leon-Kempis, R., Santiago-Machuca, A., Ortega-Pierres, G., Barry, E., Levine, M. und Gonzalez-Bonilla, C. (2002). Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)₄ on the surface of *Salmonella* enterica using the autotransporter MisL. *Infect. Immun.* 70, 3611-3620.

Russmann, H., Igwe, E.I., Sauer, J., Hardt, W.D., Bubert, A. und 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. und Donis, R.O.** (1998). Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science* 281, 565-568.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2.Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA.
- Schaible, U.E., Collins, H.L. und Kaufmann, S.H.** (1999). Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv. Immunol.* 71:267-377, 267-377.
- Shedlock, D.J. und Shen, H.** (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339.
- Shreedhar, V.K., Kelsall, B.L. und Neutra, M.R.** (2003). Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. *Infect. Immun.* 71, 504-509.
- Shu, W., Liu, J., Ji, H. und Lu, M.** (2000). Core structure of the outer membrane lipoprotein from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 299, 1101-1112.
- Sieling, P.A. und Modlin, R.L.** (2002). Toll-like receptors: mammalian "taste receptors" for a smorgasbord of microbial invaders. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 70-75.
- Sirard, J.C., Niedergang, F. und Kraehenbuhl, J.P.** (1999). Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines [In Process Citation]. *Immunol. Rev.* 171:5-26, 5-26.
- Smith, A.L., Wikstrom, M.E. und Fazekas de St, G.B.** (2000). Visualizing T cell competition for peptide/MHC complexes: a specific mechanism to minimize the effect of precursor frequency. *Immunity.* 13, 783-794.
- Spreng, S., Dietrich, G., Goebel, W. und Gentschev, I.** (2003). Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing protective listerial epitopes within a surface-exposed loop of the TolC-protein. *Vaccine* 21, 746-752.
- Suzuki, T., Lett, M.C. und Sasakawa, C.** (1995). Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J. Biol. Chem.* 270, 30874-30880.
- Tacket, C.O., Hone, D.M., Curtiss, R., III, Kelly, S.M., Losonsky, G., Guers, L., Harris, A.M., Edelman, R. und Levine, M.M.** (1992a). Comparison of the safety and immunogenicity of delta aroC delta aroD and delta cya delta crp *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. *Infect. Immun.* 60, 536-541.
- Tacket, C.O., Hone, D.M., Losonsky, G.A., Guers, L., Edelman, R. und Levine, M.M.** (1992b). Clinical acceptability and immunogenicity of CVD 908 *Salmonella typhi* vaccine strain. *Vaccine* 10, 443-446.
- Tacket, C.O., Kelly, S.M., Schodel, F., Losonsky, G., Nataro, J.P., Edelman, R., Levine, M.M. und Curtiss, R., III** (1997a). Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system. *Infect. Immun.* 65, 3381-3385.
- Tacket, C.O., Sztein, M.B., Losonsky, G.A., Wasserman, S.S., Nataro, J.P., Edelman, R., Pickard, D., Dougan, G., Chatfield, S.N. und Levine, M.M.** (1997b). Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in htrA and aroC aroD and immune response in humans. *Infect. Immun.* 65, 452-456.

- Thatte, J., Rath, S. und Bal, V.** (1993). Immunization with live versus killed *Salmonella typhimurium* leads to the generation of an IFN-gamma-dominant versus an IL-4-dominant immune response. *Int. Immunol.* 5, 1431-1436.
- Tommassen, J., Agterberg, M., Janssen, R. und Spierings, G.** (1993). Use of the enterobacterial outer membrane protein PhoE in the development of new vaccines and DNA probes. *Zentralbl. Bakteriol.* 278, 396-406.
- Ugrinovic, S., Menager, N., Goh, N. und Mastroeni, P.** (2003). Characterization and development of T-Cell immune responses in B-cell-deficient (Igh-6(-/-)) mice with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. *Infect. Immun.* 71, 6808-6819.
- Vassiloyanakopoulos, A.P., Okamoto, S. und 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.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A.J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W.T. und Fang, F.C.** (1999). Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 401, 804-808.
- Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Holden, D.W., Lucia, S.M., Dinauer, M.C., Mastroeni, P. und Fang, F.C.** (2000). *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 287, 1655-1658.
- Verma, N.K., Ziegler, H.K., Stocker, B.A. und Schoolnik, G.K.** (1995). Induction of a cellular immune response to a defined T-cell epitope as an insert in the flagellin of a live vaccine strain of *Salmonella*. *Vaccine* 13, 235-244.
- Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E. und Gros, P.** (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73, 469-485.
- Vyas, N.K., Vyas, M.N. und Quioco, F.A.** (1988). Sugar and signal-transducer binding sites of the *Escherichia coli* galactose chemoreceptor protein. *Science* 242, 1290-1295.
- Walsh, N.P., Alba, B.M., Bose, B., Gross, C.A. und Sauer, R.T.** (2003). OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* 113, 61-71.
- Waterman, S.R. und Holden, D.W.** (2003). Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol.* 5, 501-511.
- Wendland, M. und Bumann, D.** (2002). Optimization of GFP levels for analyzing *Salmonella* gene expression during an infection. *FEBS Lett.* 521, 105-108.
- Wick, M.J., Harding, C.V., Normark, S.J. und Pfeifer, J.D.** (1994). Parameters that influence the efficiency of processing antigenic epitopes expressed in *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 62, 4542-4548.
- Wick, M.J. und Pfeifer, J.D.** (1996). Major histocompatibility complex class I presentation of ovalbumin peptide 257-264 from exogenous sources: protein context influences the degree of TAP-independent presentation. *Eur. J Immunol.* 26, 2790-2799.
- Yakushi, T., Masuda, K., Narita, S., Matsuyama, S. und Tokuda, H.** (2000). A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nat. Cell Biol.* 2, 212-218.

Yang, D.M., Fairweather, N., Button, L.L., McMaster, W.R., Kahl, L.P. und Liew, F.Y. (1990). Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J. Immunol.* 145, 2281-2285.

Yarchuk, O., Jacques, N., Guillerez, J. und Dreyfus, M. (1992). Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the lacZ gene. *J. Mol. Biol.* 226, 581-596.

Yokota, N., Kuroda, T., Matsuyama, S. und Tokuda, H. (1999). Characterization of the LolA-LolB system as the general lipoprotein localization mechanism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274, 30995-30999.

Young, J.C. und Hartl, F.U. (2003). A stress sensor for the bacterial periplasm. *Cell* 113, 1-2.

Zinkernagel, R.M., Ehl, S., Aichele, P., Oehen, S., Kundig, T. und Hengartner, H. (1997). Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol. Rev.* 156:199-209, 199-209.

Lebenslauf

- 18.02.1974 Geboren in Aschaffenburg
- 1980 - 1984 Besuch der Rudolf-Stein Grundschule in Kelsterbach
- 1985 - 1993 Besuch des Justus-von-Liebig Gymnasiums in Neusäß
- 1993 - 1994 Zivildienst
- 1994-2000 Studium der Biologie (Diplom) an der Ludwig-Maximilians Universität München
- 05/1999 – 02/2000 Diplomarbeit im Institut für Mikrobiologie an der LMU unter Anleitung von Prof. Dr. Volker Müller
Titel der Arbeit: „Identifizierung der primären Na⁺-Pumpe in *Acetobacterium woodii*: Reinigung des membrangebundenen Proteins p27 und Klonierung eines p27-Genfragments“
- 05/2000 – 03/2002 Experimentelle Arbeit zu vorliegenden Dissertation bei der CREATOGEN AG, Augsburg
- 04/2002 – 06/2003 Fortsetzung der Experimentellen Arbeit am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin (Abteilung Molekularbiologie) unter Prof. Dr. Thomas F. Meyer und Dr. Dirk Bumann