

Aus dem Lehrstuhl Bakteriologie
Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

**Entwicklung eines oralen *Yersinia* Lebendimpfstoffes als Antigenträger:
Einfluss der Yop Effektorproteine auf die Immunantwort**

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

Vorgelegt von
Thorsten Sporleder
aus Siegburg

München 2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. J. Heesemann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. F.-J. Falkner von Sonnenburg Priv. Doz. Dr. U. Wintergerst
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Konrad Trülzsch
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	15.06.2005

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung	1
1.	Neue Vakzinierungsstrategien	1
1.1	Bakterielle Lebendimpfstoffe	1
1.2	<i>Salmonella</i> und <i>Yersinia</i> als orale Lebendimpfstoffe	2
2.	Die Gattung <i>Yersinia</i>	3
2.1	<i>Y. enterocolitica</i>	3
2.1.1	Vorkommen und Verbreitung	3
2.1.2	Klinisches Bild der Yersiniose	4
2.2	Pathogenitätsfaktoren	4
2.2.1	Adhärenz und Invasion in die Wirtszelle	4
2.2.2	Typ-III-Sekretionssystem und Yop Effektorproteine	5
2.2.3	Ysc Sekretionsapparat und Yop Translokation	7
2.2.4	<i>Yersinia</i> Enterotoxin Yst	9
2.2.5	Eisenaufnahme in <i>Y. enterocolitica</i>	9
3.	<i>Yersinia enterocolitica</i> als oraler Lebendimpfstoff	10
3.1	Immunantwort auf eine <i>Y. enterocolitica</i> Infektion	10
3.2	Translokation von heterologen Antigenen	10
3.3	Immunantwort auf translozierte Antigene	11
4.	Ziel der Arbeit	12
B.	Material und Methoden	13
1.	Material	14
1.1	Geräte	14
1.2	Chemikalien und Enzyme	15
2.	Bakterien, Plasmide und Primer	16
2.1	Bakterienstämme	16
2.2	Plasmide	17
2.3	Primer	18
3.	Nährmedien, Antibiotika, Anzucht und Stammhaltung	20
3.1	Nährmedien	20
3.2	Antibiotika	21
3.3	Anzucht und Stammhaltung	21

4.	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	22
4.1	Isolierung von Plasmid-DNS	22
4.1.1	Isolierung von Plasmid-DNS bis 20 µg	22
4.1.2	Isolierung von Plasmid-DNS bis 100 µg	22
4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
4.2.1	Reaktionsbedingungen der PCR	23
4.3	Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNS	24
4.3.1	Ethanol-fällung	24
4.3.2	Konzentrationsbestimmung von DNS	24
4.4	Restriktionsverdau von DNS durch Endonucleasen	25
4.5	Agarose-Gelelektrophorese	25
4.5.1	Analytische Gelelektrophorese	26
4.5.2	Präparative Gelelektrophorese	26
4.5.3	Größenbestimmung von doppelsträngigen DNS-Fragmenten	26
4.6	Transformation von DNS	26
4.6.1	Herstellung kompetenter Zellen	27
4.6.2	Elektroporation von Bakterienzellen mit DNS	27
4.7	Herstellung von <i>yop</i> Deletionsmutanten durch homologe Rekombination (ET-Klonierung)	27
4.7.1	Herstellung elektrokompetenter <i>Yersinia</i> Stämme für die Mutagenese	28
4.7.2	Primerdesign	28
4.7.3	Herstellung eines linearen PCR-Fragmentes	29
4.7.4	Elektroporation und Selektion der Mutanten	29
4.8	Wachstumskurven der <i>yop</i> Deletionsmutanten	30
5.	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	30
5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	30
5.1.1	Herstellung von Polyacrylamid-Gelen	31
5.1.2	Aufbereitung der Proben und Elektrophorese	32
5.1.3	Coomassie-Färbung	32
5.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	33
5.3	Isolierung von sekretierten Yop Proteinen aus dem Kulturüberstand	33
6.	Mausinfektionsversuche	34
6.1	Verwendete Mausstämme	34
6.2	Mauspassage	34
6.3	Infektion der Mäuse	34
6.3.1	Orale Infektion	35
6.3.2	i.v. Infektion	35
6.3.3	Intraperitoneale (i.p.) Infektion	35
6.4	Virulenzversuche im Mausinfektionsmodell	35
6.5	Serumnahme	36
6.6	Schutzversuch	36
7.	Immunologische Arbeitsmethoden	36
7.1	Immunoblot (Western Blot)	36

7.2	Bestimmung spezifischer IgG Antikörper aus Seren infizierter Mäuse durch Immunoblot	38
7.3	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay (ELISA)	38
7.4	ELISPOT-Test	39
7.5.	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	40
7.5.1	Doppelimmunfluoreszenz Assay	40
8.	Zellkultur	42
8.1	Verwendete Zellen	
8.1.1	Kultivierung von P388D ₁ Makrophagen	42
8.1.2.	Gewinnung von DCs aus Knochenmark	42
8.2	Zellzahlbestimmung	43
8.3	Infektionsexperimente mit <i>Y. enterocolitica</i>	43
8.3.1	Infektion für Immunfluoreszenz-Versuche	43
8.3.2	Infektion für Translokations-Versuche	44
8.4	<i>In vitro</i> Antigenpräsentation	44
C.	Ergebnisse	45
1.	Herstellung von stabilen <i>yop</i> Deletionsmutanten	45
1.1	Klonierung in <i>Y. enterocolitica</i>	45
1.2	Konstruktion genetisch stabiler <i>yop</i> Deletionsmutanten	45
1.3	Temperatur und Ca ²⁺ abhängiges Wachstum der <i>yop</i> Deletionsmutanten	48
1.4	Überprüfung der <i>yop</i> Deletionsmutanten im SDS-Gel und mittels Western Blot	49
2.	Virulenz der <i>yop</i> Deletionsmutanten im Mausinfektionsmodell	52
2.1	Virulenz der <i>yop</i> Deletionsmutanten nach oraler Infektion	52
2.2	Virulenz der <i>yop</i> Deletionsmutanten nach i.v. Infektion	56
2.3	Virulenzvergleich ΔYopT und WA-CpYV::CM im kompetitiven Ansatz	59
2.4	Komplementierung der ΔYopH Mutante	59
3.	Humorale Immunantwort auf <i>yop</i> Deletionsmutanten	61
3.1	Spezifische Antikörperantwort auf Yop Überstandsproteine	61
3.1.1	Detektion mittels ELISA	61
3.1.2	Detektion mittels Western Blot	62
4.	Phagozytose von <i>yop</i> Deletionsmutanten durch dendritische Zellen	64
5.	Sekretion und Translokation eines heterologen Antigens	65
5.1	Sekretion und Translokation von YopE Fusionsproteinen durch <i>yop</i> Deletionsmutanten	65
5.1.1	<i>In vitro</i> Expression und Sekretion von YopE Fusionsproteinen	66

5.1.2	Nachweis der Translokation des YopE Fusionsproteins mittels Immunfluoreszenz	67
5.1.3	Nachweis der Translokation mittels Western Blot	69
6.	Immunantwort auf YopE Fusionsproteine im Mausinfektionsmodell	70
6.1	Immunologische Untersuchungen in CB6F1 Mäusen	70
6.1.1	Stabilität der Plasmide pHR429 und pHR430 in <i>Y. enterocolitica</i>	70
6.1.2	Vergleich der Virulenz von yop Deletionsmutanten in C57BL/6 und CB6F1 Mäusen	70
6.2	Humorale und zelluläre Immunantwort auf YopE Fusionsproteine <i>in vivo</i>	71
6.2.1	CD4 und CD8 T-Zellantwort auf das sekretierte Fusionsprotein YopE ₁₋₁₈ LLO ₅₁₋₃₆₃ M45	72
6.2.2	CD4 und CD8 T-Zellantwort auf das translozierte Fusionsprotein YopE ₁₋₁₃₈ LLO ₅₁₋₃₆₃ M45	73
6.2.3	CD4 und CD8 T-Zellantwort mit Δ SodApHR430 und Δ SodA Δ YopPpHR430 im Vergleich	74
6.3	Humorale Immunantwort auf rekombinantes Listeriolysin O	75
7.	<i>In vitro</i> Antigenpräsentation von LLO₉₁₋₉₉ in dendritischen Zellen	76
8.	Bestimmung der Apoptose mittels Fluoreszenz-Mikroskopie	78
9.	Untersuchung des Schutzes gegen eine <i>L. monocytogenes</i> Infektion	79
D.	Diskussion	81
1.	Einfluss der Yop Effektorproteine auf Virulenz und Immunantwort im Mausinfektionsmodell	81
1.1	Konstruktion genetisch stabiler <i>yop</i> Deletionsmutanten	81
1.2	Virulenzstudien im oralen und i.v. Mausinfektionsmodell	82
1.3	Humorale Immunantwort auf <i>yop</i> Deletionsmutanten	86
1.4	Einfluss der Yop Effektorproteine auf Phagozytose durch dendritische Zellen	87
2.	Untersuchung der Immunantwort auf ein heterologes Antigen	88
2.1	Sekretion und Translokation eines heterologen Antigens	88
2.2	Humorale und zelluläre Immunantwort auf YopE/LLO <i>in vivo</i>	90
2.3	YopP inhibiert Antigenpräsentation <i>in vitro</i>	92
2.4	Δ YopP Lebendimpfstoff vermittelt Schutz vor einer <i>Listeria</i> Wildtyp Infektion	93
E.	Zusammenfassung	97
	Literaturverzeichnis	99
	Publikationsliste	110
	Lebenslauf	111

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APC	Antigen Präsentierende Zelle
AS	Aminosäuren
BHI	„Brain-Heart-Infusion“
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
°C	Grad Celsius
CFU	„Colony Forming Units“
Cm	Chloramphenicol
C-Terminus	Carboxylterminaler Bereich eines Proteins
d	Schichtdicke
DCs	Dendritische Zellen
DNase	Desoxyribonuclease
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid 5`-Phosphat (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)
ECM	Extrazelluläre Matrixproteine
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N`,N`-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	Und andere
FCS	Fötales Kälberserum
Fe	Eisen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GALT	„Gut Associated Lymphoid Tissue“
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	„Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor“
h	Stunde
HBSS	„Hank´s Balanced Salt Solution“
H ₂ O _{bidest}	Zweifach destilliertes Wasser
HPI	„High Pathogenicity Island“
HRP	„Horseradish Peroxidase“
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon-gamma
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter

LB	Luria-Bertani
LLO	Listeriolysin O
log ₁₀	Dekadischer Logarithmus
μ	Mikro
m	Milli, Meter
M	Molar
mAk	Monoklonaler Antikörper
MALT	„Mucosa Associated Lymphoid Tissue“
min	Minuten
MOI	„Multiplicity of Infection“
n	Nano
NK	Natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
N-Terminus	Aminoterminaler Bereich eines Proteins
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
Ω	Ohm
P	Promotor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PP	Peyersche Plaques
pYV	<i>Yersinia</i> Virulenz Plasmid
<i>p.a.</i>	Zur Analyse
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
x ^R	X-resistent
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
Sm	Streptomycin
Sp	Spectinomycin
<i>spp.</i>	Sub Species
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetate/EDTA
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tet.	Tetracyclin
TNFα	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-isothiocyanat
TTSS	Typ-III-Sekretionssystem
U	Unit/ Einheiten
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
m _v	Masse/Volumen
v _v	Volumen/Volumen

WHO	Weltgesundheitsorganisation
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
Ybt	Yersiniabaktin
Yop	<i>Yersinia</i> outer Protein
Ysc	Yop Sekretionsapparat
z.B.	Zum Beispiel

A. Einleitung

1. Neue Vakzinierungsstrategien

Einer der größten Erfolge der Medizin bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten ist die Entwicklung von Impfstoffen, die mit dem Einsatz von Kuhpockenlymphe durch den englischen Arzt Edward Jenner (1749-1823) im Jahre 1796 gegen menschliche Pockenviren ihren Anfang nahm. Genauere Kenntnisse über Art und Verbreitung von Infektionserregern ermöglichen in der Folge die systematische Entwicklung von Impfstoffen, die heute zur Prävention vieler verschiedener Infektionskrankheiten wirkungsvoll eingesetzt werden. Die weltweite Ausrottung von Pockenviren kann von der WHO im Jahre 1979 verkündet werden und auch die Ausrottung der Poliomyelitis ist ein erklärtes Ziel der WHO (Hinman *et al.*, 1998). Trotzdem gehören die Infektionskrankheiten auch heute noch zu den häufigsten Todesursachen, da gegen viele Erreger auf Grund der komplexen Pathogenität (z.B. Malaria, Cholera, HIV) bislang keine oder nur wenig wirksame Impfstoffe entwickelt werden konnten. Auch der Verlust der Wirksamkeit vorhandener Impfungen durch veränderte Erreger (z.B. Grippevirus) oder das Auftreten ganz neuer humanpathogener Erreger (SARS, HIV) erfordern die Entwicklung von neuen Impfstoffen. Die Erkenntnisse und Fortschritte in der molekularen Infektionsbiologie und der Immunologie ermöglichen immer tiefere Einblicke in die Mechanismen der Pathogenität von Erregern und der protektiven Wirtsabwehr und nehmen dadurch entscheidenden Einfluss auf die Strategie der Impfstoffentwicklung.

1.1 Bakterielle Lebendimpfstoffe

Der Einsatz von attenuierten Mikroorganismen als Vektoren für die Impfung gegen verschiedene Pathogene ist einer der vielversprechenden Ansätze bei der Entwicklung von neuen Impfstoffen (Curtiss *et al.*, 1994; Liu, 2003; Medina und Guzmán, 2001). Dabei ermöglicht die Präsentation fremder Antigene durch replikationsfähige und in ihrer Virulenz abgeschwächte bakterielle Erreger eine Impfung auch gegen andere Organismen als den Impfstamm (Medina und Guzmán, 2000). Eine effektive humorale und zelluläre Immunantwort auf fremde Antigene konnte für verschiedene Mutanten pathogener Bakterien wie *Listeria spp.*, *Mycobacteria spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* und *Yersinia spp.*, aber auch für kommensale Mikroorganismen wie *Lactobacillus spp.* gezeigt werden (Curtis *et al.*, 1994; Medina und Guzmán, 2001; Rüssmann *et al.*, 2003; Pouwels *et al.*, 1998). Die

Verfügbarkeit einer breiten Palette an attenuierten Stämmen und die Entwicklung verschiedener Expressionssysteme erlaubt die gezielte Ansteuerung von Geweben und immunkompetenten Zellen, wie z.B. antigenpräsentierende Zellen (APC), und ermöglicht dadurch eine gerichtete Modulation der Immunantwort (Medina und Guzmán, 2001).

Neben der Auswahl eines geeigneten Impfstammes ist auch die Art der Applikation ein entscheidendes Kriterium für die Auslösung einer effektiven Immunantwort. Viele Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen erfolgen durch Invasion der Erreger über die Schleimhäute in den Wirtsorganismus. Die orale Applikation eines bakteriellen Lebendimpfstoffes imitiert den natürlichen Verlauf zu Beginn einer Infektion und stimuliert immunkompetente Zellen des Mucosa assoziierten lymphatischen Gewebes (mucosa associated lymphoid tissue = MALT). Dies führt nicht nur zu einer systemischen Immunität, wie sie bei parenteraler Applikation vorherrscht, sondern löst auch eine lokale, Mucosa assoziierte Immunantwort aus, die bereits eine Kolonisierung der Schleimhäute mit dem Erreger inhibiert und so einen Krankheitsausbruch verhindern kann (Levine *et al.*, 1983; Staats *et al.*, 1994). Weitere Vorteile oraler Lebendimpfstoffe sind die einfache Applikation und die damit erhöhte *Compliance* der Patienten sowie die geringen Impfkosten durch Verwendung eines Impfträgers für verschiedene Impfungen (Medina und Guzmán, 2000).

1.2 *Salmonella* und *Yersinia* als orale Lebendimpfstoffe

In den letzten Jahren wurden verstärkt die Protein-Typ-III-Sekretions/Translokationssysteme (TTSS) von *Salmonella* und *Yersinia* als Antigen-Mikroinjektionssysteme für die Lebendimpfstoffherstellung mit einbezogen. Zusammengesetzt aus bis zu 40 Proteinen gehört das TTSS zu den komplexesten bekannten Protein-Sekretionssystemen und bewirkt die Translokation von bakteriellen Effektorproteinen in das Zytosol eukaryontischer Zellen (Hueck *et al.*, 1998; Rüssmann *et al.*, 2003). Darüber hinaus können auch fremde (heterologe) Antigene mit Hilfe des Typ-III-Sekretionssystems in das Zytosol von APCs transloziert werden (Igwe *et al.*, 2002; Rüssmann *et al.*, 1998; Dunne *et al.*, 1995). Die Tatsache, dass attenuierte Stämme von *Salmonella* und *Yersinia* eine komplexe, Mucosa assoziierte und systemische Immunantwort nach oraler Infektion im Wirtsorganismus auslösen, macht sie als mögliche orale Lebendimpfstoffe interessant (Schödel *et al.*, 1995; Levine *et al.*, 1996; Igwe *et al.*, 1999). So können Impfungen mit attenuierten *Salmonella typhimurium* Stämmen (z.B. durch Mutationen in den Genen für aromatische AS *aroA* oder das „global regulatory system“ *phoP/phoQ*) durchgeführt werden, die sich als gute Träger für Antigene von

Bakterien, Viren, Parasiten und Tumoren erweisen (Verma *et al.*, 1995; Dunne *et al.*, 1995; Karem *et al.*, 1997; Schorr *et al.*, 1991 und Medina *et al.*, 1999). Verschiedene Studien zeigen auch mit *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* eine effiziente Immunantwort auf heterologe Antigene (z.B. Cholratoxin B, CRA Protein von *Trypanosoma cruzi*, Listeriolysin O (LLO)) und belegen das protektive Potential von *Yersinia* basierten Impfstoffen (Sory *et al.*, 1990; Sory *et al.*, 1992; Rüssmann *et al.*, 2003).

2. Die Gattung *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia*, benannt nach dem Entdecker des Pest-Erregers, A. Yersin (Hongkong-Pest, 1894), umfasst bislang 11 verschiedene Arten und wird seit 1964 der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet (Frederiksen, 1964). Yersinien sind gram-negative Stäbchen, deren bekannteste Vertreter die humanpathogenen Arten *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sind (Brenner, 1979). *Y. pestis* ist der Erreger der Beulen- oder Lungenpest und führte in den vergangenen Jahrhunderten zu schweren Pandemien mit einer Letalität von bis zu 50 % in der Bevölkerung. Die enteropathogenen Arten *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* werden durch kontaminierte Nahrungsmittel übertragen und gehören zu den häufigsten bakteriellen Enteritis-Erregern (Knapp, 1988). Im Unterschied zu *Y. pestis* sind die enteropathogenen *Yersinia* peritrich begeißelt und bei ihrem Wachstumsoptimum von 28 °C beweglich. Yersinien sind psychrophil (kälteliebend) und können sich auch bei Temperaturen zwischen 0-4 °C vermehren, was zur Kälteanreicherung aus Patientenisolat genutzt werden kann. Die Pathogenität der Gattung *Yersinia* ist gekoppelt an das Vorhandensein eines 70 kb großen Virulenzplasmides (pYV) (Cornelis *et al.*, 1998).

2.1 *Y. enterocolitica*

2.1.1 Vorkommen und Verbreitung

Y. enterocolitica kann aus verschiedenen Umweltquellen wie kontaminiertem Wasser oder Pflanzenoberflächen isoliert werden, ist aber auch in Haus- und Wildtieren verbreitet, wobei das Schwein eines der Hauptreservoirs ist (Marranzano *et al.*, 1993; Tauxe *et al.*, 1987). Auf Grund von biochemischen Eigenschaften wird *Y. enterocolitica* in 6 Biovare eingeteilt (Wauters *et al.*, 1987). Das Biovar 1B kommt in Nordamerika vor und umfasst die medizinisch bedeutsamen Serotypen O:4, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:21 (Aleksic und

Bockemühl, 1990). Die in Europa vorkommenden *Y. enterocolitica* Stämme mit humanpathogener Bedeutung gehören zu den Serotypen O:3, O:5,27, O:9 und werden den Biovarien 2, 4 und 5 zugeordnet. Biovar 1A besitzt keine humanpathogene Bedeutung (Bottone, 1997).

2.1.2 Klinisches Bild der Yersiniose

Die Infektion mit *Y. enterocolitica* erfolgt meist oral über kontaminierte Nahrungsmittel wie Wasser, Milch oder Fleisch und führt nach einer Inkubationszeit von 7-10 Tagen zu einer akuten Enteritis mit unspezifischen Symptomen wie Bauchschmerzen, Fieber, wässrigen Durchfällen und Erbrechen. Weitere klinische Krankheitsbilder sind die mesenteriale Lymphadenitis, die bei 10-20 % der Patienten auftritt, eine chronisch rezidivierende Ileitis („Pseudo-Crohn“) und eine Enterocolitis. Die Yersiniose verläuft meist selbstlimitierend, kann aber auch bei Patienten mit einer Grunderkrankung (Diabetes mellitus, Leberzirrhose, Immunsuppression) zu fokal septischen Infektionen wie Hepatitis mit Leberabszessen, Endokarditis oder Osteomyelitis führen (Rabson *et al.*, 1975). Schwerere septische Verlaufsformen der Yersiniose treten auch bei Patienten mit hämolytischer Anämie (Thalassämie) und nach Desferrioxaminbehandlung bei Dialysepatienten auf. Als immunologische Folgeerkrankungen können die HLA-B27 assoziierte reaktive Arthritis und das Erythema nodosum auftreten (Dequecker *et al.*, 1980).

2.2 Pathogenitätsfaktoren

2.2.1 Adhärenz und Invasion in die Wirtszelle

Zu den Pathogenitätsfaktoren, die bei der Adhäsion und Invasion von *Yersinia* in den Wirtsorganismus eine Rolle spielen, gehören das chromosomal kodierte Invasin (*inv*) und das pYV-Plasmid kodierte Yersinia Adhäsion (*yadA*). Yersinien gelangen nach oraler Infektion in das Darm assoziierte lymphatische Gewebe (gut associated lymphoid tissue = GALT). Dabei interagiert das äußere Membranprotein Inv mit dem β 1-Integrin der M-Zellen und vermittelt dadurch Adhärenz an die Wirtszelle. Nachfolgend kommt es zur Transzytose durch die M-Zellen und somit zur Invasion von *Yersinia* in die Peyerschen Plaques (Lymphfollikel) des GALT (Autenrieth und Firsching, 1996). Inv ist nicht essentiell für die Virulenz von *Yersinia*, wird jedoch für eine effiziente Translokation der Bakterien vom Intestinaltrakt in die Peyerschen Plaques benötigt (Pepe und Miller, 1993). YadA, ein weiteres äußeres

Membranprotein, bindet an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine (ECM) wie Kollagen, Fibronectin und Laminin (Schulze-Koops *et al.*, 1993) und kann ebenfalls über β 1-Integrine die Internalisierung von *Yersinia* vermitteln (Bliska *et al.*, 1993; Yang and Isberg 1993). Durch Hemmung der Komplement vermittelten Opsonisierung der Bakterienzelle trägt es zur Phagozytoseresistenz von *Yersinia* bei (China *et al.*, 1993).

2.2.2 Typ-III-Sekretionssystem und Yop Effektorproteine

Die Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica* ermöglichen nicht nur das extrazelluläre Überleben und die Proliferation der Bakterien in lymphatischen Organen, sondern besitzen auch einen modulatorischen Effekt auf die wirtseigene Immunantwort (Cornelis, 2002). Diese Fähigkeit pathogener *Yersinia* ist an das Vorhandensein des 70 kb großen Virulenzplasmides pYV gekoppelt, das für ein Typ-III-Sekretionssystem (TTSS) kodiert. Es ermöglicht *Yersinia* die Translokation von Yop Effektorproteinen (*Yersinia* outer proteins) in das Zytosol eukaryontischer Zellen. Yops werden bei 37 °C gebildet und liegen im Zytoplasma teilweise an Yop spezifische Chaperone (Stabilisatorproteine) gebunden vor. Nach Kontakt von *Yersinia* mit der Wirtszelle werden die Yop Effektorproteine mit Hilfe des Ysc Sekretionsapparats (Yop secretion) über eine Pore in die eukaryontische Zelle „injiziert“. Dort binden sie an verschiedene Zellstrukturen und verändern so die Signaltransduktion innerhalb der Zelle oder führen zu Zytoskeletumlagerungen. *In vitro* kann die Bildung von Yops bei 37 °C induziert werden und führt in Ca^{2+} freiem Medium zur Sekretion von 12 verschiedenen Yops in den Bakterienüberstand (Heesemann *et al.*, 1986; Rosqvist *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass sechs der Yops in das Zytosol von Wirtszellen transloziert werden (YopE, YopH, YopM, YopO, YopP und YopT) (s. Tab. 1). Dabei interagieren die Effektoren YopE, YopH, YopO und YopT mit dem Zytoskelett und hemmen so die Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) und Makrophagen (Ruckdeschel *et al.*, 1996). Der 23 kDa große Effektor YopE besitzt zytotoxische Eigenschaften, interagiert mit Actin Mikrofilamenten und führt zur Abrundung und dem Ablösen der Zielzelle von der extrazellulären Matrix (Rosqvist *et al.*, 1991). YopE ist ein GTPase aktivierendes Protein und inaktiviert vor allem die kleine GTPase Rac aber auch RhoA und CDC42 durch Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP (Andor *et al.*, 2001). YopH ist eine 51 kDa große Proteintyrosinphosphatase, die zur Dephosphorylierung von Proteinen des fokalen Adhäsionskomplexes wie Paxillin, FAK (focal adhesion kinase) und p130^{Cas} führt. Neben der Zerstörung der fokalen Adhäsionskomplexe mit nachfolgender Hemmung der Phagozytose

scheint YopH zusammen mit YopE den „oxidative burst“ von PMNs und Makrophagen zu unterdrücken (Persson *et al.*, 1997; Black and Bliska, 1997; Ruckdeschel *et al.*, 1996). Einen dephosphorylierenden Einfluss in Makrophagen besitzt YopH auch auf das Fyn bindende Protein Fyb und auf SKAP-HOM, die beide an Adhäsionsprozessen beteiligt sind (Black *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte für YopH die Unterdrückung der B- und T-Zell Aktivität nachgewiesen werden (Yao *et al.*, 1999).

Die Serin/threoninkinase YopO (YpkA in *Y. pseudotuberculosis*) verfügt über eine autophosphorylierende Aktivität, die durch Actin induziert wird (Juris *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass YopO mit den GTPasen RhoA und Rac1 interagiert, wodurch die Konzentration von aktiviertem RhoA in der Zelle sinkt (Galyov *et al.*, 1993; Dukuzumuremyi *et al.*, 2000; Barz *et al.*, 2000). Das Substrat und der genaue Wirkmechanismus von YopO sind bislang nicht bekannt.

Das Effektorprotein YopT ist eine Cysteinprotease, die nur bei *Y. enterocolitica* vorkommt, und Rho GTPasen inaktiviert, indem es RhoA, Rac und Cdc42 am C-terminalen Ende aus der Verankerung in der Zellmembran löst (Zumbihl *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2002).

Die Effektorproteine YopM und YopP besitzen keinen Einfluss auf die Hemmung der Phagozytose durch *Yersinia*. YopM ist im Nucleus lokalisiert und hat möglicherweise einen hemmenden Einfluss auf die Transkription verschiedener Gene, die mit dem Zellzyklus und dem Zellwachstum assoziiert sind (Sauvonnet *et al.*, 2002). Es wurde außerdem mit der Hemmung der Thrombozytenaggregation in Zusammenhang gebracht (Leung *et al.*, 1989; Reisner and Straley, 1992). Darüber hinaus bildet YopM mit den Kinasen PRK2 und RSK1 einen Proteinkomplex (McDonald *et al.*, 2003). Kürzlich wurde gezeigt, dass YopM mit dem angeborenen Immunsystem interagiert und zu einer Suppression von NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) führt (Kerschen *et al.*, 2004). Für YopP (YopJ in *Y. pseudotuberculosis*) konnte ein immunmodulatorischer Effekt nachgewiesen werden. Dabei blockiert das Protein YopP die Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK: ERK, JNK, p38) und den Transkriptionsfaktor NF κ -B in der eukaryontischen Zelle und unterdrückt nachfolgend die Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen wie TNF α durch Makrophagen und IL-8 durch Endothelzellen. Die Hemmung von IKK β , einer Kinase, die den NF κ -B Inhibitor I κ B phosphoryliert, verhindert die Translokation von NF κ -B in den Nucleus. Durch Hemmung von MEKs (MAPK Kinasen) kommt es zur Unterdrückung der MAPK Signaltransduktion (Orth *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass YopP in Makrophagen an der Induktion von Apoptose beteiligt ist (Ruckdeschel *et al.*, 1998; Cornelis, 2002).

Yop Effektorprotein	Molekularmasse in kDa	Interaktion mit Zellstrukturen/ enzymatische Aktivität	Zellfunktion
YopE	22,9	GTPase aktivierendes Protein	Phagozytosehemmung
YopH	51	Phosphotyrosinphosphatase Dephosphoryliert FAK und p130 ^{Cas}	Phagozytosehemmung
YopM	60,1	Proteinkomplex mit PRK2 und RSK1	Suppression von NKs
YopO	81,7	Serinthreoninkinase Phosphorylierung von Actin	Phagozytosehemmung
YopP	32,5	Hemmt MAPK und NFκ-B Signalkaskaden	Apoptose von Makrophagen und immunmodulatorische Aktivität (TNFα↓, IL8↓)
YopT	35,3	Cysteinprotease, Modifiziert die GTPasen RhoA, Rac und CDC42	Phagozytosehemmung

Tab. 1: Yop Effektorproteine und ihre zellulären Zielstrukturen

2.2.3 Ysc Sekretionsapparat und Yop Translokation

Die Translokation der Yop Proteine erfolgt, wie in Abb. 1 gezeigt, mit Hilfe des Sekretionsapparats „Ysc Injectisom“ (Yop secretion), bestehend aus einem Basalkörper, der die bakteriellen Membranen durchspannt, und einer nadelförmigen Struktur, die außerhalb der Bakterienzelle liegt. Die Transkription der Gene für den Ysc Sekretionsapparat, die ebenfalls auf dem pYV Plasmid kodiert sind, erfolgt bei Körpertemperatur im Wirtsorganismus oder kann durch Ca²⁺-Mangel induziert werden (Cornelis, 2002). Neben den oben genannten sechs Yop Effektorproteinen werden auch weitere Proteine wie YopB, YopD, YopQ und LcrV sekretiert. YopB und YopD weisen beide hydrophobe Bereiche auf und sind vermutlich an der Bildung einer Translokationspore in der eukaryontischen Zellmembran beteiligt (Neyt *et al.*, 1999). LcrV (V-Antigen), ein protektives Antigen gegen Pest und Yersiniose, ist in demselben Operon kodiert und interagiert mit YopB und YopD bei der Porenbildung (Holmström *et al.*, 2001). Daneben besitzt LcrV auch eine eigene immunmodulatorische Aktivität, die durch Induktion von IL-10 zu einer Abnahme der TNF und INF-γ Spiegel in der Maus führt (Nakajima *et al.*, 1995; Sing *et al.*, 2002; Cornelis, 2002). YopQ (YopK in *Y. pseudotuberculosis*) kontrolliert möglicherweise die Translokation der Yop Effektorproteine. Für eine YopK Mutante konnte eine Hypertranslokation von Yop Proteinen in das Zytosol eukaryontischer Zellen nachgewiesen werden (Holmström *et al.*, 1997).

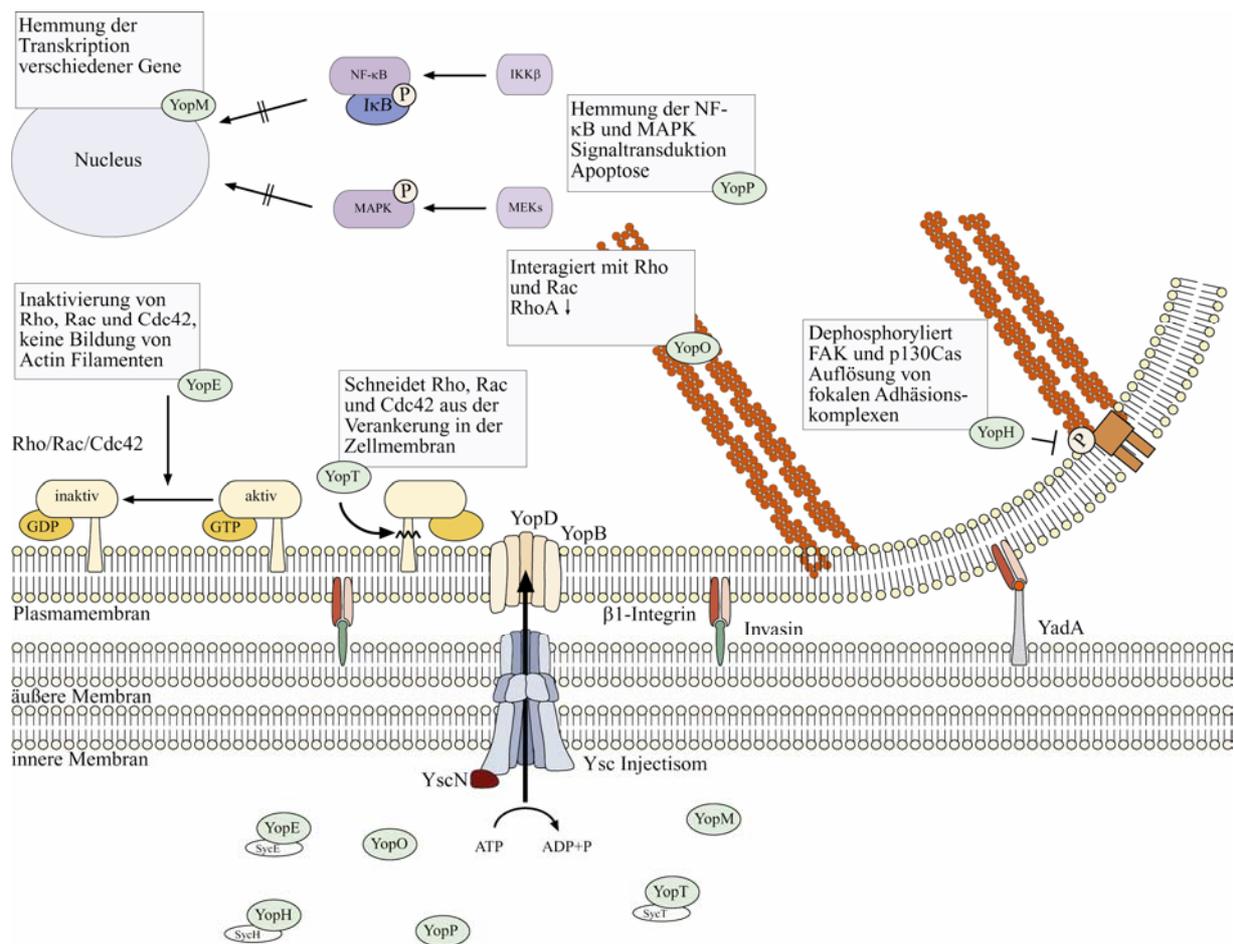


Abb. 1: Schematische Darstellung der Translokation der Yop Effektorproteine in das Zytosol von eukaryontischen Zellen:

Durch Bindung von YadaA und Inv an extrazelluläre Proteine der Wirtszelle (Integrine, ECM) kommt es zur Adhärenz der Bakterienzelle und zur Umbildung von fokalen Adhäsionskomplexen. Nach Zellkontakt werden die Yop Effektorproteine mit Hilfe des Typ-III-Sekretionsapparates in das Zytosol von eukaryontischen Zellen (z.B. APC) transloziert. Die Yop Effektorproteine werden dabei mit Hilfe des Ysc-Injectisoms und der ATPase YscN aus der Bakterienzelle exportiert. Die Translokatoren YopB, YopD und LcrV sind an der Bildung einer Pore in der eukaryontischen Plasmamembran beteiligt. Innerhalb der eukaryontischen Zelle binden die Effektorproteine an verschiedene Zellstrukturen oder modulieren wichtige Signalkaskaden. YopE, YopH, YopO und YopT interagieren in unterschiedlicher Weise mit dem Zytoskelett und besitzen so einen hemmenden Einfluss auf die Phagozytose. Der Effektor YopP induziert in Makrophagen Apoptose und vermindert die inflammatorische Immunantwort durch Interaktion mit der NF- κ B und MAPK Signaltransduktion. YopM ist im Zellkern lokalisiert und besitzt möglicherweise hemmenden Einfluss auf die Transkription verschiedener Gene (Cornelis, 2002).

2.2.4 *Yersinia* Enterotoxin Yst

Pathogene Yersinien verfügen über das hitzestabile Enterotoxin Yst, das homolog zu dem Toxin STI von *E. coli* und Guanylin, dem endogenen Aktivator der intestinalen Guanylat-Cyclase, ist. Das chromosomal kodierte Enterotoxin Yst führt durch die Aktivierung der Guanylat-Cyclase zu wässrigen Durchfällen (Delor und Cornelis, 1992).

2.2.5 Eisenaufnahme in *Y. enterocolitica*

Die ausreichende Versorgung mit Eisen ist ein entscheidendes Kriterium für das Überleben und die Proliferation von Bakterien im Wirtsorganismus. Bei vielen Stoffwechselprozessen wie z.B. dem Elektronentransport in der Atmungskette, der Nukleinsäuresynthese und dem Sauerstofftransport durch Hämoglobin ist Eisen ein essentieller Bestandteil.

Pathogene Bakterien verfügen über verschiedene Mechanismen zur Aufnahme und Speicherung von Eisen im Wirtsorganismus, die ihnen das Überleben unter Eisenmangelbedingungen ermöglichen. Dazu synthetisieren sie niedermolekulare Komplexe, sogenannte Siderophore, die von den Bakterien sezerniert werden und mit hoher Affinität Fe^{3+} -Ionen komplexieren. Die Siderophore binden dann ihrerseits an spezifische Rezeptoren der äußeren Membran und werden über Transportersysteme in das Zytosol der Bakterienzelle aufgenommen, wo es zur Freisetzung des Eisens kommt (Braun *et al.*, 1998; Earhart, 1996). Die Eisenaufnahme bei *Y. enterocolitica* erfolgt zum einen über die Bildung des Siderophors Yersiniabaktin (Ybt) als auch über die Aufnahme von fremden Siderophoren wie z.B. Ferrioxamin, Ferrichrom und Enterobaktin (Bäumler und Hantke, 1992; Koebnik *et al.*, 1993). Des Weiteren sind Yersinien in der Lage, Hämverbindungen als Eisenquelle zu nutzen (Stojiljkovic und Hantke, 1992 und 1994). Sowohl die Gene für die Synthese von Yersiniabaktin (*ybt*) als auch die für den Yersiniabaktin Rezeptor (*fyuA* = ferric yersiniabactin uptake) sind chromosomal kodiert und befinden sich auf der *high pathogenity island* (HPI), dessen G + C Anteil vom restlichen Genom abweicht. Die Genprodukte der HPI haben Einfluss auf die Virulenz und finden sich nur in den für Mäuse hochvirulenten Stämmen von *Y. enterocolitica* (Serogruppen O:8, O:13 und O:21), wohingegen den weniger virulenten Stämmen (O:3, O:5,27 und O:9) dieser Pathogenitätsfaktor fehlt (Carniel *et al.*, 1996; Heesemann *et al.*, 1993). Im Zusammenhang mit der Eisenaufnahme stehen auch die durch *Y. enterocolitica* verursachten schweren Septikämien bei Patienten mit erhöhten Eisenspiegeln auf Grund einer Hämochromatose oder einer Thalassämie.

3. *Y. enterocolitica* als oraler Lebendimpfstoff

3.1 Immunantwort auf eine *Y. enterocolitica* Infektion

Im Gegensatz zu den intrazellulären Erregern wie *Salmonella*, *Listeria* und *Mycobacteria spp.* überleben und proliferieren *Yersinia* überwiegend extrazellulär im Wirtsorganismus (Lian *et al.*, 1987; Simonet *et al.*, 1990). Dabei führt die Infektion mit *Y. enterocolitica* in der Maus zu einer humoralen Immunantwort (Gaede und Heesemann, 1995; Igwe *et al.*, 1999). Neben der Bildung von Serumantikörpern konnten auch *Yersinia* spezifische sekretorische IgA Antikörper im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge nachgewiesen werden (Van Damme *et al.*, 1992). Der Transfer von *Yersinia* spezifischen Immunglobulinen aus Seren infizierter Mäuse vermittelt einen Schutz gegen eine üblicherweise letal verlaufende *Yersinia* Infektion (Igwe *et al.*, 1999; Roggenkamp *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1993). Darüber hinaus führt eine Infektion mit *Y. enterocolitica* auch zu einer T-Zell abhängigen zellulären Immunantwort, die ein entscheidender Beitrag bei der Elimination des Erregers aus der Maus ist (Autenrieth *et al.*, 1992 und 1994; Kempf *et al.*, 1998). So führt YopH *in vitro* zu einer Präsentation im MHC-Klasse-I Kontext und stimuliert zytotoxische T-Zellen (Starnbach und Bevan, 1994). Die Bedeutung der zellulären Immunantwort für die Unterdrückung einer *Yersinia* Infektion konnte auch durch Transfer von *Yersinia* spezifischen Th1 ähnlichen CD4 T-Zelllinien oder CD8 T-Zellklonen in naive Mäuse gezeigt werden (Autenrieth *et al.*, 1992).

Die Infektion mit *Y. enterocolitica* löst somit eine komplexe Immunantwort mit der Bildung von spezifischen Antikörpern und einer zellulären Immunantwort mit der Aktivierung von CD4 und CD8 T-Zellen im Mausinfektionsmodell aus.

3.2 Translokation von heterologen Antigenen

Genauere Kenntnisse über das Typ-III-Sekretionssystem und die Translokation von Yop Effektorproteinen ermöglichen den Einsatz von heterologen Antigenen zur Impfung mit *Yersinia* gegen fremde Erreger. So wird für verschiedene Fusionen der Effektorproteine YopE und YopH mit bakteriellen und parasitären Antigenen die Auslösung einer spezifischen Immunantwort beschrieben (Sory *et al.*, 1992; Sory und Cornelis, 1994; Rüssmann *et al.*, 2003). Die Translokation des Effektorproteins YopE in das Zytosol von eukaryontischen Zellen kann mit Hilfe von Immunfluoreszenz sichtbar gemacht und durch Untersuchungen mit der Calmodulin abhängigen Adenylatcyclase, der Neomycin-Phosphotransferase oder

dem GFP als Reporter-Enzyme nachgewiesen werden (Sory und Cornelis, 1994; Rosquist *et al.*, 1994; Jacobi *et al.*, 1998). *In vitro* Untersuchungen der Sekretion und Translokation von YopE Fusionsproteinen zeigen ferner, dass YopE als Transporter genutzt werden kann, um Fremdanigene in das Zytosol von eukaryontischen Zellen zu bringen (Sory *et al.*, 1995; Schesser *et al.*, 1996; Rüssmann *et al.*, 2000). Dabei stellt sich heraus, dass die minimale Sequenz, die für die Sekretion eines heterologen Antigens benötigt wird, die N-terminalen Aminosäuren 1-15 des YopE Proteins umfasst. Für die effektive Translokation eines heterologen Antigens in das Zytosol eukaryontischer Zellen sind hingegen die N-terminalen Aminosäuren 1-50 erforderlich, die die Bindungsstelle für das YopE spezifische Chaperone (SycE) beinhalten, das für die Faltung und den Transport von YopE verantwortlich ist (Sory *et al.*, 1995; Schesser *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; Rüssmann *et al.*, 2000).

3.3 Immunantwort auf translozierte Antigene

Sory *et al.* verwenden rekombinante *Y. enterocolitica* Stämme zur Untersuchung der Immunantwort auf heterologe Antigene und können dabei mit YopE Fusionsproteinen eine Serum Antikörperantwort auf die B Untereinheit des Cholera-toxins und auf das CRA Protein (cytoplasmic repetitive antigen) von *Trypanosoma cruzi* im Mausinfektionsmodell auslösen (Sory und Cornelis, 1988; Sory *et al.*, 1990; Sory *et al.*, 1992).

In vitro Untersuchungen mit Fusionen von YopE und dem *L. monocytogenes* Antigen p60 (Murein Hydrolase p60) führen nach Translokation des Fusionsproteins durch Wildtyp *Y. enterocolitica* in das Zytosol von P388D1-Makrophagen zu einer Antigenpräsentation im MHC-Klasse-I Kontext und zur Induktion von spezifischen CD8 T-Zellen (Rüssmann *et al.*, 2000). Eine zytolytische T-Zellantwort wird außerdem für ein Fusionsprotein aus YopE und einem Tumorantigen der MAGE Familie (YopE₁₋₁₃₀/MAGE-A1) in dendritischen Zellen beschrieben (Chaux *et al.*, 1999).

Das immunogene Potential von YopE Fusionsproteinen wird *in vivo* sowohl für rekombinante *Y. pseudotuberculosis* als auch für *S. typhimurium* Stämme bestätigt. So löst die Translokation des Fusionsproteins YopE₁₋₁₃₈/LLO durch eine *Y. pseudotuberculosis* yopK Mutante in oral infizierten Mäusen eine Antigen spezifische CD4 und CD8 T-Zellantwort aus und vermittelt dadurch einen Schutz gegen eine *L. monocytogenes* Wildtyp Infektion (Rüssmann *et al.*, 2003). Eine CD8 T-Zellantwort auf die Fusionsproteine YopE₁₋₁₃₈/LLO oder YopE₁₋₁₃₈/p60 und eine protektive Immunität gegen eine *Listeria* Infektion kann auch für *S. typhimurium* gezeigt werden (Rüssmann *et al.*, 2001). Mit attenuierten *Y. enterocolitica* Stämmen ist es *in*

in vivo bislang nicht möglich gewesen, eine zelluläre Immunantwort auf translozierte, heterologe Antigene nachzuweisen, obwohl mit dem Wildtyp *in vitro* eine effektive Antigenpräsentation in einem MHC Klasse-I Kontext ausgelöst wird (Rüssmann *et al.*, 2000).

Die Translokation von heterologen Antigenen und die Induktion einer spezifischen Immunantwort machen *Y. enterocolitica* zu einem interessanten Kandidaten für die Entwicklung eines bakteriellen Lebendimpfstoffes. In vielen Studien kann für die Yop Effektorproteine eine zentrale Bedeutung für die Virulenz und die Modulation der Immunantwort nachgewiesen werden. Die Deletion einzelner *yop* Gene bietet einen möglichen Ansatz für die Entwicklung eines *Y. enterocolitica* basierten Impfstammes mit einer abgeschwächten Virulenz und einem guten immunogenen Potential.

4. Ziel der Arbeit

Im Rahmen des DFG Schwerpunktprogrammes „Neue Vakzinierungsstrategien“ und des Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“ befasst sich diese Arbeit mit der Entwicklung eines oralen *Y. enterocolitica* Lebendimpfstoffträgers und untersucht dabei den Einfluss der Yop Effektorproteine des Typ-III-Sekretionssystems auf die Immunantwort im Mausinfektionsmodell. Hierzu sollten mit artspezifischer Mutagenese diverse Yop-kodierende Gene im Virulenzplasmid pYV ausgeschaltet werden und die Mutanten auf Immunogenität gegen ein kosezerniertes YopE-Listeriolysin O (YopE/LLO) Hybridantigen untersucht werden.

Die experimentelle Doktorarbeit wurde mit folgenden Programmpunkten durchgeführt:

- Etablierung der Methode der „ET-Klonierung“ für *Y. enterocolitica* und Herstellung von sieben stabilen *yop* Deletionsmutanten (Δ YopE, Δ YopH, Δ YopM, Δ YopO, Δ YopP, Δ YopQ und Δ YopT)
- Virulenzstudien der *yop* Deletionsmutanten im oralen und intravenösen Mausinfektionsmodell
- Untersuchung der humoralen und zellulären Immunantwort auf ein transloziertes *Listeria* Antigen nach oraler Immunisierung mit *yop* Deletionsmutanten
- Immunisierung mit einem *Yersinia* basierten Impfstoff und Untersuchung des Schutzes gegen eine *Listeria monocytogenes* Wildtyp Infektion

B. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Gerät	Modell	Firma
Analysenwaagen	R160P und Pt1200	Sartorius, Göttingen
Brutschränke	Typ B 20	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator	Cytoperm 2	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer für SDS-Gele	Mini-Protean [®] -II Cell und Western Blot Apparatur	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät	Gene-Pulser II, Pulse Controller II	Bio-Rad, München
Fluoreszenz-Mikroskop	Leica DM IRB	Leica, Bensheim
Inverses Mikroskop	Axiovert	Zeiss, Jena
Homogenisatoren	HOG2 (2 ml), HOG3 (5 ml)	Hartenstein, Würzburg
Immunoblot-Apparatur	Mini-Protean Gelelektrophorese Kammer	Bio-Rad, München
PCR Cycler	PCR System 2400	Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt
pH-Meter	320 pH-Meter	Mettler, Toledo
Photometer	Ultraspec 3000 P10-P1000	Pharmacia Biotec, Frankfurt
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	Braun, Melsungen
Spannungsquellen	Power Pac 200 und 300	Bio-Rad, München
Sterilwerkbank	Herasafe HS 12	Heraeus, Hanau
Transilluminator	UVT-20 M/W	Herolab, Wiesbaden
Videophotoanlage	Kodak, Image Station 440	Kodak, Braunschweig
Wasserbad	WB/OB7-45	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Eppendorf 5417C 3K30 mit Rotoren Nr.12156 und 19776	Eppendorf, Hamburg Sigma, Deisenhofen

Tab. 2: Verwendete Geräte mit Hersteller

1.2 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme	Hersteller / Lieferant
Agarose, Antibiotika, Concanavallin A, L-Arabinose, Ethanol 96 %, Ethidiumbromid, Triton X-100, Tween 20, Formalin 37 %	Sigma, Deisenhofen
Desoxynucleotidtriphosphate (dNTP's), Proteinase K, Restriktionsenzyme, Taq-Polymerase, Benchmark® Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Expand-High-Fidelity Polymerase System	Roche, Mannheim
p-Nitrophenylphosphat-di-Natrium (pNPP)	Fluka, Taufkirchen
rekombinantes Listeriolysin O (LLO) Protein	Diatheva, Fano Italien
Coomassie Brilliant Blue R250	Biomol, Hamburg
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll, Dassel
LLO-Peptide	Jerini, Berlin
Medien für die Bakterienkultur: Brain Heart Infusion Medium (BHI-Medium), Müller-Hinton II Agar <i>Yersinia</i> selektiv Agar (CIN-Agar), Palcam Listerien Agar nach Van Netten <i>et al.</i>	Becton and Dickinson, Heidelberg Merck, Darmstadt
Zellkulturmedien: alpha MEM Eagle, DMEM, HBSS	PAN, Aidenbach
CD11c (N418) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
GM-CSF granulocyte-macrophage colony stimulating factor	R&D Systems, Wiesbaden

Tab. 3: Verwendete Chemikalien

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth oder Sigma bezogen. Die Chemikalien verfügten über den Reinheitsgrad *p.a.* (zur Analyse).

2. Bakterien, Plasmide und Primer

2.1 Bakterienstämme

Stammbezeichnung	Beschreibung	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>endA1 hsdR17</i> (r _k -m _k ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal ^R) <i>relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) _{U169} (ϕ 80 <i>lacZ</i> dM15)	Hanahan, 1983
S17-1 λ pir	<i>λpir⁺ tra⁺ Km^R</i>	Miller und Mekalanos, 1988
<i>L. monocytogenes</i>		
sv 1/2a EGD		Köhler et. al., 1990
<i>Y. enterocolitica</i>		
WA-314	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8, Biogruppe 1B, klinisches Isolat, pYVO8 ⁺	Heesemann und Laufs, 1983
WA-C	plasmidloses Derivat von WA-314, Serotyp O:8, Biogruppe 1B	Heesemann und Laufs, 1983
WA-CpYV::CM	WA-C mit pYV::CM, Cm ^R	diese Arbeit
Δ YopE	WA-C mit pYV Δ yopE, Kan ^R	diese Arbeit
Δ YopH	WA-C mit pYV Δ yopH, Kan ^R	diese Arbeit
Δ YopM	WA-C mit pYV Δ yopM, Kan ^R	diese Arbeit
Δ YopM* (WA-314pYV Δ M::Kan)	WA-C mit pYV Δ yopM, mit Kan ^R -Kassette in Position 661 des <i>yopM</i> Gens	Truelzsch et. al., 2003
Δ YopO	WA-C mit pYV Δ yopO, Kan ^R	diese Arbeit
Δ YopP	WA-C mit pYV Δ yopP, Kan ^R	diese Arbeit
Δ YopQ I	WA-C mit pYV Δ yopQ, Kan ^R	diese Arbeit
Δ YopQ II	WA-C mit pYV Δ yopQ+50AS, Kan ^R	diese Arbeit
Δ YopT	WA-C mit pYV Δ yopT, Kan ^R	diese Arbeit
Δ SodA	WA-C mit pYV Δ sodA, Kan ^R	Roggenkamp et. al., 1997
Δ SodA Δ YopP	WA-C mit pYV Δ sodA Δ yopP, Kan ^R , Cm ^R	diese Arbeit

Tab 4: Verwendete Bakterienstämme

2.2 Plasmide

Plasmide	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pYV	<i>Y. enterocolitica</i> Serotyp O:8	Heesemann und Laufs, 1983
pYV Δ yopE	Kan ^R -Kassette im <i>yopE</i> Gen	diese Arbeit
pYV Δ yopH	Kan ^R -Kassette im <i>yopH</i> Gen	diese Arbeit
pYV Δ yopM	Kan ^R -Kassette im <i>yopM</i> Gen Position 661	diese Arbeit
pYV Δ yopO	Kan ^R -Kassette im <i>yopO</i> Gen	diese Arbeit
pYV Δ yopP	Kan ^R -Kassette im <i>yopP</i> Gen	diese Arbeit
pYV Δ yopQ	Kan ^R -Kassette im <i>yopQ</i> Gen	diese Arbeit
pYV Δ yopT	Kan ^R -Kassette im <i>yopT</i> Gen	diese Arbeit
pYV::CM	Cm ^R -Kassette im nicht kodierenden Bereich von pYV	diese Arbeit
pYV Δ yopP::Cm	Cm ^R -Kassette im <i>yopP</i> Gen	Ruckdeschel <i>et al.</i> , 1997
pACYC177	Klonierungsvektor Amp ^R Kan ^R	Chang und Cohen, 1978
pACYC184	Klonierungsvektor Cm ^R Tet ^R	Chang und Cohen, 1978
pHR429	<i>yopE</i> ₁₋₁₃₈ <i>llo</i> ₅₁₋₃₆₃ <i>m45</i> PCR-Fragment in EcoRV-Sall Schnittstelle von pACYC184	Rüssmann <i>et al.</i> , 2003
pHR430	<i>yopE</i> ₁₋₁₃₈ <i>llo</i> ₅₁₋₃₆₃ <i>m45</i> PCR-Fragment in EcoRV-Sall Schnittstelle von pACYC184	Rüssmann <i>et al.</i> , 2003
pYopHSycH	<i>yopH-sycH</i> PCR-Fragment in HindIII Schnittstelle von pACYC184	Truelzsch <i>et al.</i> , 2003
pKD46	Red System: Rekombinasen <i>redα</i> und <i>redβ</i> , Exonucleaseinhibitor <i>redγ</i> , <i>ParaB</i>	Datsenko und Wanner, 2000

Tab. 5: Verwendete Plasmide

2.3 Primer

Primer wurden von der Firma Metabion (Martensried) oder Thermo (Ulm) hergestellt. Sie wurden HPLC gereinigt und lyophilisiert geliefert. Die Konzentration von 100 pmol/μl wurde durch Lösen mit H₂O bidest eingestellt.

Primer	5'-3' Sequenz	Homologiearm pYV
YopE-ET-for	GCTATTTTCCCACTAAGATAACCTTGTTTTAATAGCC AAGGGAATAAATAGTCGAAGTTCCTATTCTCTAGAA AGTATAGGAACTTCTAAGATGATCTTCTTGAGATC	<i>yopE</i> 38993-39045
YopE-ET-rev	TCAGGCGTTTTAAGGCTGAAAAGTGCAACCTATAG CAGGACTAGTCACCATAGAAGTTCCTATTCTCTAGA AAGTATAGGAACTTCACAACCAATTAACCAATTCTG	<i>yopE</i> 39758-39706
YopH-ET-for	TAGTATAGGCGTGTATTTAATTAGTTCTTAATTTAAT TAAGGAGGGAAGCGAAAGTATAGGAACTTCTAAGA TGATCTTCTTGAGATC	<i>yopH</i> 35998-36047
YopH-ET-rev	AGCGTATATATCTTAGTAATTTTATTTACTCATAGGA ATAAATATTTACAGAAAGTATAGGAACTTCACAACC AATTAACCAATTCTG	<i>yopH</i> 37504-37455
YopM-ET-for	ACGTTGTAATGATATTTAACGTGACGCAGAATTATG AACGCTCTTGCGTAGAAGTTCCTATTCTCTAGGAAA GTATAGGAACTTCTAAGATGATCTTCTTGAGATC	<i>yopM</i> 7673-7722
YopM-ET-rev	GTTTTTTTGAAAAACCCGATAATAAAAACATTTTC AGAAAGGCATTCAATGAAGTTCCTATTCTCTAGAAA GTATAGGAACTTCACAACCAATTAACCAATTCTG	<i>yopM</i> 8827-8877
YopO-ET-for	CCCTCTTACTCAATCTACTCAATCGGTTATTAATGG GGATGAGTAAAGCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGT ATAGGAACTTCTAAGATGATCTTCTTGAGATC	<i>yopO</i> 55695-55744
YopO-ET-rev	AATCTTAGCCCATTCTCGGATATATCAACTCAAGGC TTAGGGGGCACTTGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAG TATAGGAACTTCACAACCAATTAACCAATTCTG	<i>yopO</i> 57935-57990
YopP-ET-for	CCGTCTGTCAATTCATACTACTGTTAACTCCCTGAA TAAGGATAAATAAGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGT ATAGGAACTTCTAAGATGATCTTCTTGAGATC	<i>yopP</i> 58191-58300
YopP-ET-rev	AGAAAGAGCTGAACCGTATTCCCATACTGGAGCAA GATTTCCAAAATACAGAAGTTCCTATTCTCTAGAAA GTATAGGAACTTCACAACCAATTAACCAATTCTG	<i>yopP</i> 59168-59217
YopQ-ET-for	GACGGTTATTAATAAGTGTAGTTTATAAAGTAAATT TTGGAGTAGTAACTGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAG	<i>yopQ</i> 2240-2290

	TATAGGAACTTCTAAGATGATCTTCTTGAGATC	
YopQ-ET-rev	TTAACCTTTAACATAATCAACTATCATATCCCAAAC TCTTTAATATAGCTGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGT ATAGGAACTTCACAACCAATTAACCAATTCTG	<i>yopQ</i> 2840-2890
YopQ-ET-for + 50 AS	GTTACTACTGCGCTACTGCTCATTACTGAGAACGG ATGTTTGTTCATTGTGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAG TATAGGAACTTCTAAGATGATCTTCTTGAGATC	<i>yopQ</i> 2390-2440
YopT-ET-for	TCAATTTATCGGTATAGCAAAATAATGGCTAACATA AATAGATTATACAGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAG TATAGGAACTTCTAAGATGATCTTCTTGAGATC	<i>yopT</i> 3301-3351
YopT-ET-rev	GCCAAGCTTCAGGAAAAGCTGTTGCATAAGTTCTGT GAAGGTTGTCTGCAAAGGTCCTATTCTCTAGAAAG TATAGGAACTTCACAACCAATTAACCAATTCTG	<i>yopT</i> 4321-4371
CM-ET-for	TGCGCCGAATAAATACCTGTGCGCTGAATGAAGTAC GGGAAATCACAGATAAATGGCTGTATGAATAGGGG	48541-48591
CM-ET-rev	TTAAGGGCACCAATAACTGCCAGAGGCAGAAAACG TTGCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG	48731-48781

Tab. 6: Verwendete Primer

3. Nährmedien, Antibiotika, Anzucht und Stammhaltung

3.1 Nährmedien

Sterilisation von Nährmedien erfolgte durch Autoklavieren (121 °C, 1 bar Überdruck für 20 min).

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	10 g Bacto Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L H ₂ O _{bidest}
LB-Agar	pH 7,4-7.6 mit NaOH einstellen Zur Verfestigung wurde dem LB-Medium 15 g/l Bacto Agar zugesetzt
Einfriermedium	LB-Medium mit 20 % Glycerol als Zusatz
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 250 mM KCl 20 mM Glucose ad 1 L H ₂ O _{bidest}

Alle weiteren Medien wurden über die Firmen Becton and Dickinson (Heidelberg) oder Merck (Darmstadt) bezogen (s. Tab. 3).

3.2 Antibiotika

Selektion von Bakterienstämmen erfolgte mit Hilfe verschiedener Antibiotika Resistenzen. Antibiotika Lösungen wurden sterilfiltriert (0.22 µm Sterilfilter) und erst kurz vor Verwendung den Medien zugegeben.

Antibiotika	Abkürzung	Lösungsmittel	Stammlösung mg/ml	Endkonzentration µg/ml
Ampicillin	Amp ^R	H ₂ O bidest	100	100
Chloramphenicol	Cm ^R	70 % Ethanol	20	20
Kanamycin	Kan ^R	H ₂ O bidest	50	50
Spectinomycin	Sp ^R	H ₂ O bidest	50	50
Streptomycin	Sm ^R	H ₂ O bidest	100	100
Tetracyclin	Tet ^R	70 % Ethanol	15	15

Tab. 7: Verwendete Antibiotika

3.3 Anzucht und Stammhaltung

- E. coli* Inkubation bei 37 °C in LB-Medium
- Y. enterocolitica* Inkubation bei 27 °C in LB-Medium / BHI-Medium
- L. monocytogenes* Inkubation bei 37 °C in LB Medium

Die Stämme wurden 12-16 Stunden im entsprechenden Medium angezüchtet und bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit sterilem PBS gewaschen, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei – 80 °C gelagert.

Die Bakterienzahl der eingefrorenen Aliquots wurde durch Ausplattieren mehrerer Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension auf Mueller-Hinton II Agar ermittelt und als koloniebildende Einheiten (colony forming units = CFU) erfasst.

4. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

4.1 Isolierung von Plasmid-DNS

4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNS bis 20 µg

Die Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNS erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden). Nach Anzucht der Kulturen über Nacht wurden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Plasmide anschließend durch Anionenaustauscherchromatographie abgetrennt. Die Plasmidisolierung erfolgte wie vom Hersteller beschrieben.

4.1.2 Isolierung von Plasmid-DNS bis 100 µg

Größere Mengen Plasmid-DNS wurden mit dem Nucleobond AX 100 Kit von der Firma Macherey-Nagel (Düren) durchgeführt. Ebenfalls basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse wurden die Plasmide durch Anionenaustauscherchromatographie gereinigt. Die Plasmidisolierung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der spezifischen Vervielfältigung eines DNS-Abschnittes. Zunächst wird der Doppelstrang der Ausgangs-DNS durch Erhitzen in zwei Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Danach lagern sich die Primer an die komplementären Einzelstränge an (Annealing). Die thermostabile DNS-Polymerase verlängert in Gegenwart von Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTP's) die Primer entlang der DNS-Matrize (Elongation). Die so entstandenen DNS-Doppelstränge werden im nächsten Zyklus wiederum aufgeschmolzen (Denaturierung). Dieser Zyklus von Denaturierung, Annealing und Elongation wird ca. 30-35 mal wiederholt und führt so zu einer exponentiellen Vervielfältigung des entsprechenden DNS-Abschnittes. Eine Elongationsphase von sieben Minuten am Ende der Reaktion ermöglicht das Auffüllen noch unvollständiger DNS-Abschnitte (Saiki *et al.*, 1988).

4.2.1 Reaktionsbedingungen der PCR

Als Template für die Polymerase-Kettenreaktion wurde entweder ein Bakterienzellysate oder aufgereinigte DNS verwendet.

Zur Gewinnung eines Bakterienzellysates wurde eine Kolonie in 100 µl H₂O_{bidest} gekocht (90 °C, 10 min) und anschließend abzentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden als Template für die PCR verwendet. Die aufgereinigte DNS wurde je nach Konzentration 1:20-1:100 verdünnt.

Reaktionsansatz	DNS		5 µl
	Primer I (100 µM)		1 µl
	Primer II (100 µM)		1 µl
	dNTP's (je 2 mM)		10 µl
	10x Reaktionspuffer		10 µl
	Polymerase		1 µl
	H ₂ O _{bidest}		ad 100 µl
	Reaktionsprogramm	Denaturierung	94 °C
	Denaturierung	94 °C	30 sec
	Annealing	x °C	30 sec
	Elongation	72 °C	x min
	Elongation	72 °C	7 min

Die „Annealing“-Temperatur lag ca. 2-4 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer.

Die Elongationszeit richtete sich nach der verwendeten Polymerase:

Taq-Polymerase	1 min pro 1 kb DNS
Expand-High-Fidelity Polymerase	1,5-2 min pro 1 kb DNS

Der mittlere Zyklus von Denaturierung, Annealing und Elongation wurde 30-35 mal wiederholt. PCR-Produkte wurden mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt.

4.3 Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNS

4.3.1 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung dient der Reinigung z.B. nach Verdau oder der Konzentrierung von DNS-Lösungen.

DNS Lösungen wurden mit 10 % (v/v) 3 M Kaliumacetat-Lösung (pH 5,2) versetzt und nach Zugabe des 2 fachen Volumens EtOH_{abs} gemischt und für 30 min bei – 80 °C inkubiert.

Nach Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 30 min wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen. Die Lösung wurde abermals bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge oder an der Luft getrocknet.

DNS wurde in H₂O_{bidest} aufgenommen und bei – 20 °C gelagert.

4.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentrationsbestimmung der DNS erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Die DNS Proben wurden mit H₂O_{bidest} im Verhältnis 1:20, 1:50 und 1:100 verdünnt und die optische Dichte (OD₂₆₀) im Vergleich zu H₂O_{bidest} bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte näherungsweise mit der Formel $1 \text{ OD}_{260} \cong 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

4.4 Restriktionsverdau von DNS durch Endonucleasen

Restriktionsenzyme sind in der Lage, bestimmte DNS-Abschnitte (sog. Palindrome) zu erkennen und diese spezifisch zu schneiden. Die so entstandenen Teilstücke besitzen charakteristische Enden.

Restriktionsansatz	DNS-Lösung	x μ l
	Restriktionsenzym	2-3 U/ μ g DNS
	10x Puffer	1 μ l
	H ₂ O _{bidest}	ad 10 μ l

Die Inkubationszeit und die Temperatur der jeweiligen Reaktionen richtete sich nach den verwendeten Enzymen und den Angaben des Herstellers.

4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Geladene Makromoleküle wie DNS-Fragmente lassen sich durch Gelelektrophorese auftrennen. Dabei wandern die negativ geladenen DNS-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode und werden auf Grund ihrer Molekularmasse im Agarose-Gel aufgetrennt. Die relative Mobilität des DNS-Fragmentes hängt linear vom Logarithmus der Molekularmasse ab.

Elektrophoresepuffer (1x TAE Puffer)	40 mM Tris/HCl, pH 8,2 20 mM Eisessig 2 mM EDTA
10x Auftragspuffer	30 % (v/v) Glycerin 0,25 % (m/v) Bromphenolblau 0,25 % (v/v) Xylencyanol
Agarosegel	0,8-1,2 % (m/v) Agarose in 1x TAE
Ethidiumbromid-Färbebad	1 μ g Ethidiumbromid pro ml H ₂ O _{bidest}

4.5.1 Analytische Gelelektrophorese

0,8-1,2 % (m/v) Agarose wurden in TAE-Puffer aufgekocht bis eine klare homogene Lösung entstand, die nach Abkühlung auf 50 °C in einen Gelschlitten gegossen wurde. Das erstarrte Gel wurde in die Gelkammer eingelegt und mit 1x TAE Puffer überschichtet. Die DNS-Proben wurden 1:10 mit Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Proben wurden bei einer Spannung von 90 V elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde ca. eine halbe Stunde im Ethidiumbromid-Färbebad inkubiert und anschließend zehn Minuten in H_2O_{bidest} entfärbt. Bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) im Transilluminator fluoresziert das in die DNS eingelagerte Ethidiumbromid. Das Bandenmuster wurde mit Hilfe der Photoanlage aufgenommen (s. Tab. 2).

4.5.2 Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Gelelektrophorese erfolgte prinzipiell wie die analytische Gelelektrophorese (s. B.4.6.2). Die Gele wurden nur kurz im Ethidiumbromid-Färbebad inkubiert. Die Bande der gewünschten DNS wurde unter UV-Licht möglichst exakt ausgeschnitten und anschließend mit dem Gel Extraktionskit der Firma Quiagen nach Herstellerangaben gereinigt.

4.5.3 Größenbestimmung von doppelsträngigen DNS-Fragmenten

Die Größenbestimmung von doppelsträngigen DNS-Fragmenten erfolgte mit Hilfe eines internen Standards. Dazu wurden eine 1 kb DNA Leiter sowie eine 100 bp DNA Leiter der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

4.6 Transformation von DNS

Mit Hilfe der Elektroporation lassen sich fremde DNS-Moleküle in das Zytosol von elektrokompentenen Bakterienzellen transformieren.

4.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

Eine über Nacht (ÜN) Bakterienkultur wurde im Verhältnis 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0,5 bis 0,6 wachsen gelassen. Die Bakteriensuspension wurde 10-15 min auf Eis stehen gelassen, bevor die Zellen bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert wurden. Nach zweimaligem Waschen mit H_2O_{bidest} wurden die Zellen in 10 % (v/v) Glycerin/ H_2O_{bidest} resuspendiert und abermals abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 % (v/v) Glycerin/ H_2O_{bidest} aufgenommen und die Aliquots bei -80 °C gelagert (Hanahan, 1983).

4.6.2 Elektroporation von Bakterienzellen mit DNS

Die Bakterienzellen wurden auf Eis langsam aufgetaut und mit der zu transformierenden DNS leicht gemischt. Die Mischung wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette eingefüllt (Dower et al., 1988). Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser II (s. Tab. 2).

Elektroporationsbedingungen: Spannung 2500 V, Widerstand 200 Ω , Kapazität 25 μ F bei einer Entladungszeit von 4-5 msec

Die Mischung wurde in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und eine Stunde bei entsprechender Temperatur (27 °C für *Yersinia*, 37 °C für *E. coli*) zur phänotypischen Expression inkubiert. Selektion von Bakterien erfolgte durch Anzucht auf LB-Agar Platten mit Antibiotikum.

4.7 Herstellung von *yop* Deletionsmutanten durch homologe Rekombination (ET-Klonierung)

Die Herstellung der *yop* Deletionsmutanten erfolgte mit der Methode der „ET-Klonierung“. Das Prinzip der „ET-Klonierung“ beruht auf der homologen Rekombination eines PCR-Fragmentes mit dem entsprechenden Genabschnitt im Chromosom oder auf einem Plasmid (Datsenko und Wanner, 2000). Ein zusätzlich eingeführtes Plasmid (pKD46) kodiert für zwei Rekombinasefunktionen $red\alpha$ und $red\beta$ sowie einen Exonucleaseinhibitor $red\gamma$. Alle drei Funktionen werden durch den Arabinose induzierbaren Promotor P_{araB} kontrolliert. Die Replikation des Plasmides ist Temperatur abhängig, was bei Temperaturen über 30 °C zum Verlust des Plasmides führt. In die mit pKD46 ausgestatteten Bakterien wird dann ein lineares

PCR-Fragment transformiert. Durch homologe Rekombination wird das PCR-Fragment mit dem entsprechenden Genabschnitt im Chromosom oder Plasmid ausgetauscht. Die „ET-Klonierung“, ursprünglich benannt nach den Rekombinasefunktionen RecE und RecT, ist eine effektive Methode zur Herstellung bakterieller und viraler Mutanten. Auf Grund der hohen Rekombinationseffizienz von red α und red β ist der Einsatz sehr kurzer homologer Strukturen (50 bp), die sich leicht durch PCR herstellen lassen, möglich. Die aufwendige Konstruktion von Plasmiden, wie sie bei den klassischen Klonierungsstrategien erforderlich ist, konnte damit umgangen werden.

4.7.1 Herstellung elektrokompenter *Yersinia* Stämme für die Mutagenese

Die Herstellung elektrokompenter Zellen erfolgte wie oben beschrieben (s. B.4.7.1) mit *Y. enterocolitica* WA-314 (Serotyp O:8).

Nach Transformation des Plasmides pKD46 in elektrokompente *Yersinia* wurde auf Amp^R-Agar Platten selektioniert. Die Kontrolle der Transformation erfolgte mit dem QIAprep Miniprep Kit (s. B.4.1.1). Nach Picken einer Kolonie wurde eine ÜN-Kultur in LB-Medium mit 50 μ g/ml Amp angesetzt. Die verdünnte ÜN-Kultur (1:100 in LB-Medium mit 50 μ g/ml Amp) wurde zur Induktion der Rekombinasefunktionen mit 0,1 % L-Arabinose versetzt. Die Bakteriensuspension wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien gewaschen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert (s. B.4.7). Die hier genannten Induktions- und Wachstumsbedingungen wurden experimentell für *Yersinia* ermittelt.

4.7.2 Primerdesign

Die Primer für das PCR-Fragment setzten sich aus zwei Bereichen zusammen, einem Homologiearm am 5' Ende, dessen Sequenz durch die flankierende Sequenz der Ziel-DNS bestimmt wurde, und der 3' Region, die für den Primer der Resistenzkassette kodierte. Die optimale Länge des Homologiearmes lag zwischen 40 und 60 bp, die der 3' Region des Primers für die Resistenzkassette zwischen 18 und 30 bp. Damit ergaben sich Primer mit einer Länge von ca. 70 bp, deren Herstellung nicht unkritisch war und besondere Anforderungen an die Aufreinigung stellte (HPLC-Reinigung, Hersteller s. B.2.3).

4.7.3 Herstellung eines linearen PCR-Fragmentes

Die Herstellung des PCR-Fragmentes erfolgte im wesentlichen wie in Abschnitt B.4.2 beschrieben. Allerdings stellen die Länge der Primer besondere Bedingungen an die PCR-Reaktion. So liegen die Schmelzpunkte der Primer wesentlich höher als bei üblichen Primern, wodurch die „Annealing“-Temperatur angepasst werden musste. Um die Fehlerquote der PCR-Reaktion herabzusetzen, wurde eine Polymerase mit „proof reading“ Funktion (Expand High Fidelity, Roche) verwendet. Als Matritze für die Antibiotikaresistenz wurde die Kan^R-Kassette des Plasmides pACYC174 (accession number X06402) benutzt.

PCR-Bedingungen	Denaturierung	95 °C	5 min
	Denaturierung	95 °C	1 min
	Annealing	64 °C	1 min
	Elongation	72 °C	2 min
	Elongation	72 °C	10 min

Das PCR-Fragment wurde mit dem Quiagen PCR Purification Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Überschüssiges Template pACYC177 im Reaktionsansatz wurde durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (10 U/μl) entfernt (s. B.4.4). Das PCR-Fragment wurde anschließend durch ethanolische Fällung gereinigt und aufkonzentriert (s. B.4.3.1).

4.7.4 Elektroporation und Selektion der Mutanten

Nach Transformation des PCR-Fragmentes in die elektrokompenten *Yersinia* (s. B.4.7.2) wurden die *yop* Deletionsmutanten auf Kan^R-Agar Platten selektioniert (Cm^R-Agar für WA-C(pYV::CM)). Durch homologe Rekombination des PCR-Fragmentes mit dem entsprechenden Gen-Abschnitt auf dem pYV-Plasmid wurde das entsprechende *yop* durch eine Kan^R-Kassette ersetzt. Die Kontrolle der Mutagenese und der korrekten Expression aller anderen Yops erfolgte im SDS-Gel (s. B.5.1). Des weiteren wurde die Mutation im Western Blot (s. B.7.1) und durch PCR (s. B.4.2) bestätigt. Durch Temperaturwechsel auf 37 °C konnte das Plasmid aus den *yop* Deletionsmutanten wieder entfernt werden.

Um chromosomale Defekte durch die Mutagenese auszuschließen, wurden die pYV-Plasmide der Mutanten isoliert (s. B.4.1.2) und in einen plasmidlosen WA-C Stamm transformiert.

4.8 Wachstumskurven der *yop* Deletionsmutanten

Zur Kontrolle des Temperatur und Ca^{2+} abhängigen Wachstumsverhaltens der *yop* Deletionsmutanten wurden die Stämme in LB-Medium verdünnt und auf eine Ausgangs- OD_{600} von 0,05 eingestellt. Die Wachstumskurven der *yop* Deletionsmutanten wurden im Vergleich zu WA-314 bei 37 °C in Anwesenheit von Ca^{2+} durch Messung der OD_{600} nach 1, 2, 3, und 4 h ermittelt.

5. Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Ebenso wie DNS-Moleküle können auch Proteine im elektrischen Feld auf Grund ihrer Ladung durch Elektrophorese aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen werden die Proteine zunächst in Gegenwart von β -Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat (SDS) bei 95 °C gekocht (denaturiert). Das β -Mercaptoethanol reduziert dabei vorhandene Disulfidbrücken zwischen Cysteinen, das anionische Detergenz SDS bricht Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen auf, wodurch die Proteine komplett entfaltet werden. Das SDS bindet quantitativ an die Polypeptide, wobei sich die negative Ladung des Moleküls proportional zur Größe des Polypeptids und somit zum Molekulargewicht verhält. Im elektrischen Feld wandern die SDS beladenen Polypeptide je nach Molekulargewicht unterschiedlich schnell zur Anode und trennen sich so auf. Durch Färbung mit Coomassie-Blau werden die Proteine sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Proteinmarkers können die Molekulargewichte bestimmt werden.

5.1.1 Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

Die Herstellung von Polyacrylamid-Gelen erfolgte mit Hilfe der Mini Protean Gelelektrophorese Kammer (s. Tab. 2).

Glasplatten wurden in ein Gießgestell eingespannt und der Zwischenraum zunächst mit Trenngel bis ca. 1,5 cm unter den Rand der beiden Glasplatten gefüllt. Um eine scharfe Trennlinie zu erhalten, wurde das Trenngel mit 1 ml 2-Butanol überschichtet. Nach ca. einer halben Stunde Polymerisation wurde das 2-Butanol wieder entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und der Kamm für die Taschen blasenfrei eingesetzt. Nach weiteren 30 min war das Gel gehärtet und einsatzbereit.

Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank nicht länger als eine Woche.

Trenngel 10 %	Acrylamid (Acrylamid 30 %, Bisacrylamid 0,8 %)	3,7 ml	
	Trenngel-Puffer (Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8)	5,0 ml	
	SDS (10 %)	200 µl	
	H ₂ O _{bidest}	1,1 ml	
	Temed	20 µl	
	APS	40 µl	
	Sammelgel 3 %	Acrylamid (Acrylamid 30 %, Bisacrylamid 0,8 %)	0,37 ml
		Trenngel-Puffer (Tris-HCL 0,5 M, pH 6,8)	1,1 ml
SDS (10 %)		50 µl	
H ₂ O _{bidest}		0,85 ml	
Temed		20 µl	
APS		20 µl	

10x SDS Laufpuffer	Tris	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	SDS	10 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
4x Probenpuffer	Tris	0,4 g
	SDS	1,2 g
	Glycerin	7,5 ml
	β-Mercaptoethanol	2,5 ml
	Bromphenolblau (2 % Lösung)	0,5 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 50 ml
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R 250	1,5 g
	Methanol	455 ml
	Eisessig	80 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 5000 ml

5.1.2 Aufbereitung der Proben und Elektrophorese

Die Proteine wurden mit Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95 °C denaturiert. Nach dem Einsetzen der Gele in die Protean Gel-Kammer wurde die Kammer bis zum oberen Rand mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben wurden in die vorgesehenen Taschen pipettiert (ca. 30 µl je Tasche) und die Elektrophorese bei 200 V Spannung und 50 mA durchgeführt.

5.1.3 Coomassie-Färbung

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel 2 h oder über Nacht mit der Coomassie-Lösung gefärbt. Zur Entfärbung wurde das Gel entweder für mehrere Stunden in ein Entfärbepuffer (Destained Puffer) gelegt oder im Wasserbad ausgekocht. Das Gel wurde unter Vakuum bei 80 °C für ca.1 h getrocknet (Slab Gel Dryer, BioRad).

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteine wurde der Standard „Benchmark® Prestained Protein Ladder“ verwendet (s. Tab. 3).

5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die quantitative Bestimmung von Proteinen erfolgte mit dem Protein Assay von Bio-Rad. Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue an Proteine kommt es zu einem Farbumschlag von rotbraun zu blau, dessen Absorptionsmaximum bei $\lambda = 595$ nm liegt. Die Absorption wurde photometrisch bestimmt und die Konzentration der Proteine nach Bestimmung einer Eichgerade (1-50 μ g BSA) gemäß Herstelleranleitung berechnet.

5.3 Isolierung von sekretierten Yop Proteinen aus dem Kulturüberstand

Bei einer Temperatur von 37 °C und unter Zugabe von EGTA sowie $MgCl_2$ (Ca^{2+} -Mangel) erfolgt in BHI-Medium die Sekretion der Yop Proteine in den Kulturüberstand (Heesemann et al., 1986). Zum Nachweis der eingeführten Mutationen in das pYV-Plasmid wurden die Yop Proteine aus dem Bakterienüberstand isoliert und im SDS-Gel aufgetrennt (s. B.5.1). Nach Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) und anschließender Reinigung ergibt sich ein typisches Bandenmuster im SDS-Gel.

Eine ÜN-Kultur (27 °C, Zusatz von Antibiotika) wurde 1:40 in BHI-Medium verdünnt und bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert. Stimulation der Sekretion erfolgte durch Zugabe von EGTA, Glucose und $MgCl_2$. Nach Inkubation bei 37 °C für weitere 3 h wurde die Kultur für 15 min bei 7500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Kulturüberstand abgenommen.

Proteine wurden mit 10 % (v/v) TCA gefällt und 1 h auf Eis stehen gelassen. Danach wurde bei 14000 rpm und 4 °C für 30 min abzentrifugiert.

Das Pellet wurde mit eiskaltem Aceton resuspendiert, 15 min auf Eis stehen gelassen und bei 14000 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Der letzte Waschschrift erfolgte mit $H_2O_{bidest.}$ Das Pellet wurde in 30 μ l Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen (s. B.5.1).

Sekretionsmedium	BHI-Medium	37 g
	EGTA	5 mM
	Glucose	0,2 % (m/v)
	MgCl ₂	10 mM
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

6. Mausinfektionsversuche

6.1 Verwendete Mausstämme

Weibliche C57Bl/6 und CB6F1 Mäuse im Alter von 6-8 Wochen der Firma Charles River WIGA (Sulzfeld, Deutschland) wurden nach der Lieferung 7 Tage unter Quarantäne gehalten, bevor sie in den Versuch genommen wurden. Die Haltung der Tiere erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen in einzelbelüfteten Käfigen mit positiv/negativ Druck der Firma Rereg (Waldkraiburg). Steriles Mäuse-Zuchtfutter und steriles Trinkwasser wurde *ad libitum* bereitgestellt.

6.2 Mauspassage

Die Mauspassage der Bakterienstämme wurde mit 1×10^6 CFU intraperitoneal (i.p.) in C57Bl/6 Mäusen durchgeführt. Die Bakterien wurden nach 24 h durch Spülung des Peritoneums mit 5 ml PBS reisoliert und auf antibiotikahaltigen LB-Agar Platten ausplattiert. Gepickte Kolonien der *yop* Deletionsmutanten wurden im SDS-Gel auf die Sekretion der Yop Effektorproteine hin kontrolliert (s. B.5.1). Die Stämme wurden über Nacht in antibiotikahaltigem LB-Medium angezogen und nach Zentrifugation in 1 ml Einfriermedium aufgenommen (s. B.3.1). Die Aliquots wurden bei -80 °C eingefroren.

6.3 Infektion der Mäuse

Die Einfrierkulturen der Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Die Bakterienkultur wurde auf die gewünschte Konzentration Bakterien eingestellt und nach Infektion durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf Müller-Hinton II Agar kontrolliert.

6.3.1 Orale Infektion

Die orale Infektion der Mäuse mit Bakterien wurde mit einem Volumen von 50 µl durchgeführt, wobei entweder eine Pipette mit Pipettenspitze oder eine Schlundsonde verwendet wurde.

6.3.2 i.v. Infektion

Nachdem die Mäuse ca. 15 min unter einer Rotlichtlampe gehalten wurden, wurde ein Volumen von 100 µl einer Bakteriensuspension mit Hilfe einer Spritze in die Schwanzvene appliziert.

6.3.3 Intraperitoneale (i.p.) Infektion

Bei der i.p. Infektion wurde ein Volumen von 50 µl einer Bakteriensuspension durch das Peritoneum der Maus mit Hilfe einer Spritze verabreicht.

6.4 Virulenzversuche im Mausinfektionsmodell

Um den Einfluss der Yop Proteine auf die Virulenzeigenschaften von *Y. enterocolitica* zu untersuchen, wurden Virulenzstudien im Mausinfektionsmodell durchgeführt. Gruppen von jeweils 6 C57/Bl6 Mäusen wurden i.v. oder oral mit Bakteriensuspensionen infiziert. Nach oraler Infektion wurde an den Tagen 2, 5, 7, 12 und 21 die Anzahl der reisolierten Keime als CFU in Leber, Milz, Peyerschen Plaques und dem Lumen des Dünndarms bestimmt. Nach i.v. Infektion wurde an den Tagen 2 und 4 Leber und Milz entnommen und die Anzahl der CFU auf *Yersinia* selektiv Agar (CIN-Agar) ermittelt.

Die eingefrorenen Aliquots (s. B.3.3) wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die Konzentration der Bakteriensuspension wurde durch Verdünnen mit PBS auf die gewünschte CFU eingestellt.

Infektion der Mäuse erfolgte oral mit 1×10^8 CFU oder i.v. mit 4×10^4 CFU der entsprechenden Stämme (s. B.6.3). Nach Tötung der Mäuse durch Vergasung mit CO₂ für 10 min und aseptischer Entnahme der Organe unter einer Sterilwerkbank wurden die Organe in 1 ml (Peyersche Plaques und Milz) oder 5 ml (Leber) PBS mit 0,1 % (v/v) Tergitol und 0,1 % (m/v)

BSA homogenisiert. Der entnommene Dünndarm wurde mit 5 ml dieser Lösung gespült. 100 µl der Homogenisate wurden in Schritten von 1:10 in sterilem PBS verdünnt. Die verdünnten Bakteriensuspensionen wurden auf CIN-Agar ausplattiert (100 µl) und bei 27 °C für 48 h inkubiert. Die Gesamtkeimzahl in den Organen wurde nach Auszählen der CFU errechnet.

6.5 Serumnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der Schwanzvene mit Hilfe einer Spritze nach 15 min Bestrahlung mit Rotlicht. Das Blut wurde ca. eine halbe Stunde bei Raumtemperatur (RT) geronnen und danach bei 7500 rpm für 15 min abzentrifugiert. Die Lagerung der Seren erfolgte bei -20 °C.

6.6 Schutzversuch

Gruppen von je 6 CB6/F1 Mäusen wurden mit Impfstämmen in einer Konzentration von 1×10^8 CFU oral infiziert (s. B.6.3.1). Als Kontrolle wurde eine weitere Gruppe von Mäusen mit einer Konzentration von 5×10^3 CFU *L. monocytogenes* i.p. infiziert (s. B.6.3.3). 8 Wochen später wurden die Mäuse mit einer i.v. Gabe *L. monocytogenes* (1×10^3 CFU) infiziert. Nach drei Tagen wurde die Gesamtkeimzahl in der Milz durch verschiedene Verdünnungen der Homogenisate auf PALCAM Listerien selektiv Agar bestimmt. Die Platten wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert, die Kolonien ausgezählt und die Gesamtkeimzahl als CFU errechnet.

7. Immunologische Arbeitsmethoden

7.1 Immunoblot (Western Blot)

Der Western Blot ist eine Methode zur spezifischen Detektion von Proteinen mit Hilfe einer Antikörper-Antigen Reaktion (Towbin et al., 1979). Dabei werden die im SDS-Gel (s. B.5.1) aufgetrennten Proteine durch Elektrophorese auf eine Membran (z.B. Nitrocellulose) transferiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen werden freie Valenzen geblockt, bevor die Membran mit dem ersten Antikörper inkubiert wird. Nach mehrmaligem Waschen wird ein zweiter Antikörper aufgetragen, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet.

Die Kopplung des zweiten Antikörpers z.B. an ein Enzym ermöglicht die Detektion nach Zugabe eines entsprechenden Substrates.

Das SDS-Gel wurde 1 h lang bei einer Stromstärke von 350 mA in einer Minigel Blotting Kammer (Bio-Rad) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Zum Blocken freier Bindungsstellen wurde die Membran über Nacht mit einer 2 % (m/v) BSA/PBS-Lösung inkubiert.

Anschließend wurde die Membran mit einem gegen das gewünschte Protein gerichteten Antikörper (Ak) für 1 h bei RT inkubiert. Die Inkubation mit einem zweiten Ak (1:10000) erfolgte ebenfalls für 1 h bei RT. Die Detektion der Membran wurde mit einem ECL Kit (Amersham Pharmacia) bei der Verwendung eines Peroxidase (Horseradish Peroxidase = HRP) gekoppelten Ak oder mit einem BCIP/NBT-Blue Liquid Substrate System (Sigma) bei der Verwendung der Alkalischen Phosphatase (AP) als Konjugat durchgeführt.

Nach jedem Schritt wurde 3x mit Waschpuffer gewaschen.

1x Western Blot Puffer	Tris	25 mM
	Glycin	190 mM
Blockierungspuffer	BSA	2 % (m/v) in PBS
Waschpuffer	Tween 20	0,05 % (v/v) in PBS

Antikörper	Verdünnung	Konjugat	Herkunft/Referenz
Polyklonale Kaninchen anti-YopO, anti-YopQ und anti-YopT Antiseren	1:5000	-	Labor G. Wilharm, Labor A. Roggenkamp
Kaninchen anti-IgG	1:10000	HRP	Amersham Pharmacia, Freiburg
Kaninchen anti-IgG	1:10000	AP	Amersham Pharmacia, Freiburg

Tab. 8: Verwendete Antikörper

7.2 Bestimmung spezifischer IgG Antikörper aus Seren infizierter Mäuse durch Immunoblot

Yops wurden aus dem Kulturüberstand isoliert und durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese aufgetrennt (s. B.5.1). Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (s. B.7.1). Zur Bestimmung der spezifischen IgG Antikörper aus den Seren infizierter Mäuse wurden Seren vom Tag 21 nach Infektion 1:100 verdünnt und als erster Antikörper verwendet. Die Detektion erfolgte wie in B.7.1 beschrieben.

7.3 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Dabei wird ein Protein an eine feste Phase (z.B. eine Mikrotiterplatte) gebunden. Zur Sättigung freier Bindungsstellen auf der festen Phase wird mit 3 % (m/v) BSA inkubiert. Im nächsten Schritt wird ein spezifischer Antikörper an das fixierte Protein quantitativ gebunden. Ein zweiter Antikörper dient zur Identifizierung des ersten Antikörpers und ist mit einem Enzym gekoppelt (z.B. HRP oder AP). Die Detektion erfolgt nach Zugabe des entsprechenden Substrates photometrisch.

Die Mikrotiterplatte wurde mit 50 μ l/Napf einer Proteinlösung (sekretierte Yops 30 μ g/ml oder rekombinantes Listeriolysin O (LLO) 100 ng/ml über Nacht bei 4 °C gecoatet. Anschließend wurden freie Bindungsstellen mit 150 μ l je Napf 3 % (m/v) BSA in PBS für 1,5 h bei 37 °C geblockt. Die Mikrotiterplatten wurden mit 100 μ l/Napf Testseren (s. B.6.5) als ersten Antikörper in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 in PBS bei 37 °C für 1 h inkubiert. Als zweiter Antikörper wurden mit AP gekoppelte anti-IgA, anti-IgG und anti-IgM Ak (100 μ l/Napf) in einer Verdünnung von 1:10000 (1,5 h bei 37 °C) eingesetzt. Nach jedem Schritt wurde dreimal mit 200 μ l PBS 1 % (m/v) BSA gewaschen. Als Substrat für die Farbreaktion wurden 50 μ l/Napf einer p-Nitrophenylphosphat (pNPP)-Lösung (1 mg/ml Substratpuffer s.u.) verwendet. Die Farbreaktion wurde nach 15 min mit 50 μ l/Napf 1 N NaOH geblockt. Die Messung erfolgte bei $\lambda = 405$ nm im Photometer (s. Tab. 2). Die Bestimmung der Antikörperantwort wurde gemessen als \log_{10} der letzten Verdünnung, die einen Unterschied von 0,1 der optischen Dichte (OD_{405}) im Vergleich mit einem negativen Kontrollserum ergab.

Substratpuffer für pNPP	Diethanolamin	48,5 ml
	NaN ₃	100 mg
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	400 mg
	H ₂ O bidest	ad 500 ml

Auf pH 9,8 einstellen und vor Gebrauch auf 28 °C erwärmen

7.4 ELISPOT-Test

Zum Nachweis IFN- γ bildender T-Lymphozyten nach Infektion mit *Yersinia* Stämmen wurde ein ELISPOT-Test durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Form des ELISA. Splenozyten immunisierter Mäuse wurden mit einem spezifischen Peptid zur Bildung von IFN- γ angeregt, das mit zwei weiteren Antikörpern in einer Farbreaktion als Punkte (Spots) sichtbar gemacht wurde.

Die Nitrocellulosemembran einer ELISPOT-Mikrotiterplatte (silent screen plates, Nunc, Wiesbaden) wurde mit einem anti-IFN- γ -Ak 1:500 in PBS (10 μ l/ml) über Nacht beschichtet (50 μ l je Napf). Nach Entnahme der Milz infizierter Mäuse (5 ml DMEM mit 10 % (v/v) FCS), Zerkleinerung der Milz im Homogenisator und Reinigung der Splenozyten durch ein Zellsieb wurde die Zellsuspension mit 1200 rpm bei 20 °C für 10 min zentrifugiert. Erythrozyten wurden mit 2 ml NH₄Cl (0.15 M, pH 7.4) lysiert und die Lyse nach 5 min mit 5 ml Medium (DMEM mit 10 % (v/v) FCS) beendet. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Pellet in T-Zell-Medium (s.u.) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt (s. B.8.2) und eine Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro 100 μ l eingestellt. 100 μ l Zellsuspension pro Napf wurden in einer Mikrotiterplatte vorinkubiert (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte). Dabei erfolgte die Induktion der T-Zellen mit einem CD4 (LLO₁₉₀₋₂₀₁) oder einem CD8 (LLO₉₁₋₉₉) spezifischen T-Zell Epitop in einer Konzentration von 10^{-4} M für 4 h bei 37 °C. Die so aktivierten T-Zellen wurden dann in die ELISPOT-Platten überführt (1×10^5 Zellen/Napf) und über Nacht (12-16 h) inkubiert. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen mit Concanavallin A, einem Lectin, das T-Zellen unspezifisch stimuliert, inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem Biotin gekoppelten Ratten anti-IFN- γ -Ak (1 μ l/ml) und einem Peroxidase Streptavidin Konjugat. Als Substrat für die Farbreaktion wurde 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) in Dimethylformamid-Puffer (DMF, s.u.) verwendet (20 mg AEC in 50 ml DMF-Puffer).

Die Menge der Antigen spezifischen T-Zellen wurde als Anzahl der gebildeten Spots ermittelt. Das Detektionslimit lag bei <5 IFN- γ -bildende Zellen pro 10^5 Splenocyten.

T-Zell-Medium	HEPES 1 M	5 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	nicht essentielle Aminosäuren	5 ml
	FCS	5 ml
	L-Glutamin	5 ml
	β -Mercaptoethanol	500 μ l
	alpha MEM Eagle	500 ml
DMF-Puffer	Dimethylformamid	2,5 ml
	Natriumacetat Lösung 50 mM	47,5 ml
	H ₂ O ₂ 30 %	25 μ l

7.5. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Der Einsatz von Antikörpern, die spezifisch an ein Antigen binden, ermöglicht die Identifizierung bestimmter Strukturen in Zellen und Geweben. Dabei wird die Zielstruktur zunächst mit einem ersten Ak markiert und dieser durch einen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zweitantikörper (z.B. FITC (Fluorescein) = grün; TRITC (Rhodamin) = rot) sichtbar gemacht

7.5.1 Doppelimmunfluoreszenz Assay

Mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenz können verschiedene Zellstrukturen mit unterschiedlichen Immunfluoreszenz-Farbstoffen gleichzeitig angefärbt werden.

Für die Untersuchungen der Immunfluoreszenz wurden ca. 1×10^6 Zellen (P388D1 Makrophagen oder dendritische Zellen (DCs) mit 1200 rpm auf Deckgläschen in 24-Napf-Zellkulturschalen zentrifugiert (s. B.8.1). Nach Infektion der Zellen mit Bakterien (s. B.8.3.1) wurden die Zellen mit einer 3,7 % (v/v) Formaldehyd/PBS Mischung für 10 min fixiert. Die Zellen wurden mit PBS dreimal gewaschen und mit einer 3 % (m/v) BSA/PBS Mischung über Nacht geblockt. Zur Detektion extrazellulärer Strukturen wurde zunächst mit 1 ml eines

Struktur spezifischen IgG Ak (s. Tab. 9) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit je 1 ml PBS. Die Bindung eines TRITC gekoppelten anti-IgG Ak erfolgte ebenfalls für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die eukaryontischen Zellen mit je 1 ml pro Napf 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 3 min permeabilisiert. Anschließend wurde dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Intrazelluläre Strukturen wurden nach Inkubation mit einem zweiten IgG Ak (1 h bei RT) und erneutem Waschen mit PBS mit einem FITC gekoppelten anti-IgG Ak sichtbar gemacht. Überschüssige Ak wurden durch drei letzte Waschschrte entfernt.

Die Deckgläschen wurden umgedreht (Zellseite nach unten), auf Objektträgern mit einem Tropfen Fluoprep und mit Nagellack luftdicht fixiert und im Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet (s. Tab. 2). Bilder wurden digital abgespeichert und bearbeitet.

Antikörper	Verdünnung	Konjugat	Herkunft/ Referenz
gereinigter polyklonaler anti-YadA IgG Ak	1:100	-	Labor G. Wilharm
monoklonaler anti-M45 IgG Ak	1:500	-	Labor H. Rüssmann
anti-Maus IgG Ak	1:1000	FITC	Dianova
anti-Maus IgG Ak	1:1000	TRITC	Dianova

Tab. 9: Verwendete Antikörper

8. Zellkultur

8.1 Verwendete Zellen

8.1.1 Kultivierung von P388D₁ Makrophagen

P388D₁ Makrophagen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen in DMEM, das mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) einer Mischung aus Penicillin/Streptomycin supplementiert war, bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Eine konfluent gewachsene Kultur wurde mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend für ca. 10 min mit 2 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung versetzt. Die abgelösten Zellen wurden nach Inaktivierung der Protease (Zusatz von 5 ml DMEM) mit PBS gewaschen und in 5 ml DMEM aufgenommen. Für die Infektionsexperimente wurden die Zellen entweder in 24-Napf-Zellkulturschalen (1 ml Medium pro Napf) oder in 175 cm² Zellkulturflaschen (25 ml Medium) subkultiviert. Nach Bestimmung der Zellzahl (s. B.8.2) wurden die Zellen entsprechend des Medienvolumens und der erforderlichen Zelldichte gemischt und bis zur gewünschten Konfluenz wachsen gelassen.

8.1.2. Gewinnung von DCs aus Knochenmark

Die Gewinnung von DCs aus Knochenmark von Balb/C Mäusen erfolgte wie bei Lutz *et al.* beschrieben (Lutz *et al.*, 1998). Die Knochenmarkszellen wurden in modifiziertem α -MEM Eagle Medium (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10 % (v/v) FCS, 10 ng GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor; R&D Systems, Wiesbaden), 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 50 μ M β -Mercaptoethanol angezüchtet. 2×10^6 Knochenmarkszellen wurden in eine Petrischale überführt und alle drei Tage mit 100 μ l GM-CSF enthaltendem Medium ergänzt. Vor Versuchsbeginn wurden die DCs mit MACS (Magnetic Cell Sorting of Mouse Leukocytes) CD11c Microbeads inkubiert und mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung über eine Säule nach Anleitung des Herstellers gereinigt (CD11c (N418) MicroBeads, s. Tab. 3). Verwendet wurden DCs für Antigenpräsentationsassays, Apoptoseversuche und zur Bestimmung der Phagozytoserate.

8.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mittels Hämatocytometer (Neubauer-Zählkammer). Durch Trypsin-EDTA Behandlung abgelöste Zellen (s. B.8.1) wurden mit PBS gewaschen und in 5 ml DMEM resuspendiert. 90 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau-Lösung (0,5 % (m/v) Trypanblau in 0,85 % (m/v) NaCl-Lösung) gemischt. Davon wurden 10 µl in die Zählkammer pipettiert und die Anzahl der Zellen pro Quadrat bestimmt. Die Zellkonzentration wurde folgendermaßen errechnet:

ausgezählte Zellzahl x 10 x 10⁴ = Anzahl Zellen/ml

8.3 Infektionsexperimente mit *Y. enterocolitica*

Eine ÜN-Kultur (27 °C, LB-Medium) der entsprechenden *Yersinia* Stämme wurde im Verhältnis 1:100 in BHI-Medium verdünnt und für ca. 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Bakterienzahl erfolgte mittels einer Eichgeraden photometrisch (OD₆₀₀). Die Infektion der eukaryontischen Zellen wurde je nach Bedarf mit einer MOI (multiplicity of infection = Verhältnis Anzahl Bakterien zu Anzahl eukaryontischer Zelle) von 1, 10 oder 100 durchgeführt.

8.3.1 Infektion für Immunfluoreszenz-Versuche

Für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen im Mikroskop wurden DCs und P388D₁ Makrophagen auf Deckgläser in 24-Napf-Zellkulturschalen in einer Konzentration von 2x10⁶ Zellen/ml subkultiviert (s. B.8.1). 1 h vor Infektion mit Bakterien wurde das Medium nach dreimaligem Waschen mit PBS durch HBSS (Ca²⁺ und Antibiotika frei) ersetzt. Nach Einstellen der Bakteriensuspension auf die gewünschte Konzentration (s. B.8.2) wurden die eukaryontischen Zellen mit einer MOI von 1, 10 oder 100 infiziert. Die Infektionszeit betrug je nach Experiment zwischen 60-300 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit einer 3,7 % (v/v) Formaldehyd/PBS Mischung für 10 min fixiert.

8.3.2 Infektion für Translokations-Versuche

Die Bestimmung der Translokation eines YopE Fusionsproteins erfolgte modifiziert wie bei Collazo und Galan beschrieben (1997). P388D₁ Makrophagen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90 % angezchtet (s. B.8.1.1) und mit einer MOI von 10 mit Bakterien für 5 h infiziert (s. B.8.2). Nicht adhärenente Bakterien wurden durch Waschen mit 10 ml PBS entfernt und Zell assoziierte Bakterien mit 100 µg/ml Gentamicin abgetötet. Zell assoziierte Yops wurden durch Proteinase K Behandlung (30 µg/ml, 15 min bei 37 °C) eliminiert. Detektion der translozierten Proteine erfolgte nach Lyse der Makrophagen mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 (3 min) im Western Blot (s. B.7.1).

8.4 *In vitro* Antigenpräsentation

In vitro Antigenpräsentation wurde im Labor Geginat (Mannheim) mit dendritischen Zellen (DCs) und mit *L. monocytogenes* spezifischen CD8 T-Zellen nach Inkubation mit einem *Listeria* spezifischen Peptid (LLO₉₁₋₉₉) bestimmt. Dabei wurde die Induktion von LLO₉₁₋₉₉ spezifischen CD8 T-Zellen durch Messung des in den Zellüberstand sekretierten IFN-γ im ELISA gemessen (s. B.7.3)

CD8 T-Zellen gegen das H-2K^d spezifische Epitop LLO₉₁₋₉₉ wurden aus der Milz von *L. monocytogenes* infizierten BALB/C Mäusen gewonnen und mit P815 Zellen, die mit dem humanen B7.1 Gen (P815/B7) transfeziert waren, in Anwesenheit von 10⁻⁹ M des Peptides mehrfach restimuliert (Azuma et al., 1993; Škoberne et al., 2002). CD8 T-Zellen wurden in T-Zell-Medium mit einem Zusatz von 100 U rekombinatem murinem IL-2 (R&D Systems, Wiesbaden) gehalten (s. B.7.4).

Dendritische Zellen wurden mit den Bakterienstämmen in 96 Napf Mikrotiterplatten mit einer MOI von 1, 10 oder 100 infiziert und für 10 min bei 600 rpm zentrifugiert. Nach Inkubationsintervallen von 1 h, 2 h und 4 h bei 37 °C wurden die DCs gewaschen und assoziierte Bakterien mit 100 µg/ml Gentamicin abgetötet. Nach weiteren 18 h bei 37 °C wurden die Zellen mit 3,7 % (v/v) Formaldehyd fixiert. Die DCs wurden mit 5x10⁴ T-Zellen pro Napf für 12 bis 18 h bei 37 °C inkubiert. Zellüberstände wurden abgenommen und die IFN-γ-Konzentration in einem spezifischen ELISA bestimmt (s. B.7.3).

C. Ergebnisse

1. Herstellung stabiler *yop* Deletionsmutanten

Pathogene *Yersinien* verfügen über ein 70 kb großes pYV-Plasmid, das für ein Typ-III-Sekretionssystem kodiert und die Translokation von Yop Effektorproteinen in das Zytosol von eukaryontischen Zellen ermöglicht. Durch systematische Mutagenese der *yop* Gene und Untersuchung der *yop* Deletionsmutanten im Mausinfektionsmodell sollte ein möglicher Einfluss der Effektorproteine auf die Virulenz und die immunogenen Eigenschaften von *Yersinia* nachgewiesen werden.

1.1 Klonierung in *Y. enterocolitica*

Als Verfahren für die Herstellung der *yop* Deletionsmutanten wurde die neue Rekombinationsmethode der ET-Klonierung für *Y. enterocolitica* etabliert (s. B. Material und Methoden 4.8). Ursprünglich für *E. coli* entwickelt, ermöglichte die ET-Klonierung, die Mutagenese direkt in *Yersinia* durchzuführen. Dadurch konnte die aufwendige Konstruktion von Plasmiden, wie sie bei den klassischen Klonierungsstrategien erforderlich ist, umgangen werden. Zur Etablierung der Methode wurden die optimalen Induktions- und Wachstumsbedingungen für *Yersinia* experimentell ermittelt (s. B.4.8.1). Durch homologe Rekombination mit Hilfe der Rekombinasen Red α und Red γ wurden die *yop* Gene auf dem pYV-Plasmid mit einem PCR-Fragment ausgetauscht. Das Prinzip der ET-Klonierung in *Yersinia* ist in Abb. 2 dargestellt.

1.2 Konstruktion genetisch stabiler *yop* Deletionsmutanten

Für die Untersuchungen im Mausinfektionsmodell wurden *yop* Deletionsmutanten für die sechs Effektorproteine YopE, YopH, YopM, YopO, YopP, YopT sowie für YopQ konstruiert, indem der kodierende Bereich des jeweiligen *yop*-Gens durch eine Kan^R-Kassette ersetzt wurde.

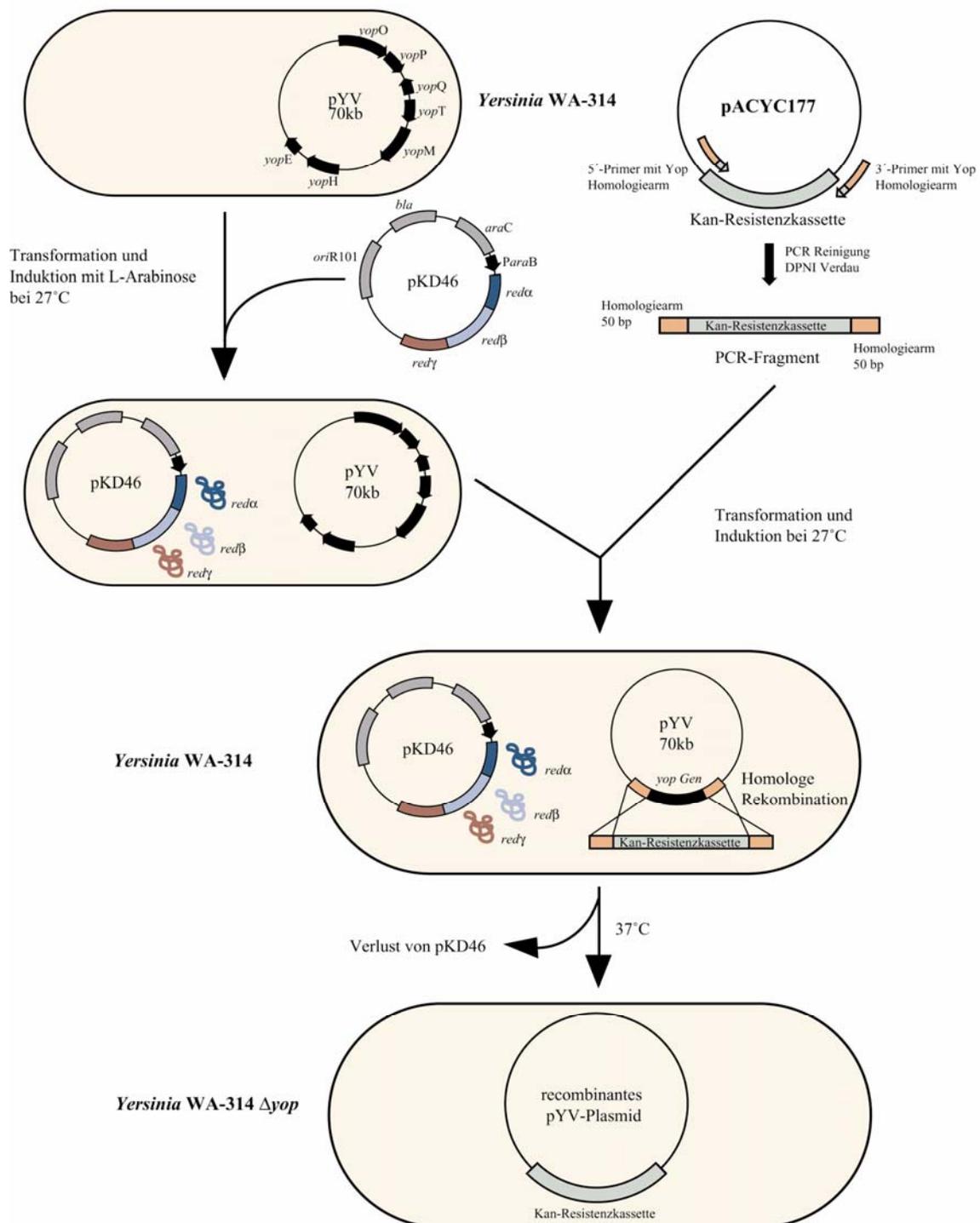
Mutagenese in *Y. enterocolitica*

Abb. 2: Prinzip der ET-Klonierung in *Y. enterocolitica*. Nach Transformation des Plasmides pKD46 in den *Yersinia* Wildstamm WA-314 wurde die Expression der Rekombinasen *redα* und *redβ* und des Exonucleaseinhibitors *redγ* bei 27 °C durch Zugabe von 0,1 % Arabinose induziert. Das PCR-Fragment bestand aus einer Kan^R-Kassette, die von zwei Homologiearmen, deren Sequenzen durch die Primer festgelegt waren, flankiert wurde. Durch homologe Rekombination des PCR-Fragmentes mit dem pYV-Plasmid wurde das entsprechende *yop*-Gen durch eine Kan^R-Kassette ersetzt, was die Selektion der Mutanten auf Kan^R-Agarplatten ermöglichte. Durch Temperaturwechsel auf 37 °C kam es zum Verlust des Plasmides pKD46.

Zunächst wurde ein PCR-Fragment generiert, das aus einer Kan^R-Kassette bestand und durch zwei 50 bp große Homologiearme, deren Sequenzen sich von den stromaufwärts und stromabwärts liegenden Sequenzen des entsprechenden *yop*-Gens ableiteten, flankiert wurde (s. Abb. 2). Zur Vermeidung von Einflüssen auf die Transkription nachfolgender Gene (polare Effekte) wies die Kan^R-Kassette keine transkriptionelle Terminatorstruktur auf.

Die Primer für das PCR-Fragment (ET-Primer) bestanden aus zwei Bereichen, dem Primer für die Kan^R-Kassette (21 bp), abgeleitet von dem Plasmid pACYC177 (accession number X06402), sowie dem Homologiearm (50 bp) für den kodierenden Bereich außerhalb des Gens (s. Tab. 10). Die Auswahl der homologen Sequenzen auf dem pYV-Plasmid wurde mit der Sequenz pYVa127/90 (Genbank accession number NC004564) vorgenommen.

<i>yop</i> -Gen Sequenz pYVe8081	<i>Y. enterocolitica</i> Mutante	Primer ET for Homologiearm	Primer ET rev Homologiearm
<i>yopE</i> 39046-39705	ΔYopE	YopEETfor 38993-39045	YopEETrev 39758-39706
<i>yopH</i> 36048-37454	ΔYopH	YopHETfor 35998-36047	YopHETrev 37504-37455
<i>yopM</i> 7723-8826	ΔYopM	YopMETfor 7673-7722	YopMETrev 8827-8877
<i>yopO</i> 55745-57934	ΔYopO	YopOETfor 55695-55744	YopOETrev 57935-57990
<i>yopP</i> 58301-59167	ΔYopP	YopPETfor 58191-58300	YopPETrev 59168-59217
<i>yopQ</i> 2291-2839	ΔYopQ	YopQETfor 2240-2290	YopQETrev 2840-2890
<i>yopT</i> 3352-4320	ΔYopT	YopTETfor 3301-3351	YopTETrev 4321-4371

Tab. 10: *yop* Deletionsmutanten: Sequenzbereiche der *yop*-Gene und der Bereiche auf dem pYV-Plasmid, die für die Homologiearme der ET-Primer ausgewählt wurden (pYVa127/90; accession number NC004564).

Der für die Elektroporation kompetente *Yersinia* Stamm WA-314 (s. Tab. 4) wurde mit dem Plasmid pKD46 transformiert (s. B.4.7). Rekombinase- und Exonucleasefunktionen wurden durch Induktion mit 0,1 % Arabinose für 4 h in LB-Medium aktiviert. In die so vorbereiteten Zellen wurde das jeweilige PCR-Fragment transformiert und die deletierten *yop* Mutanten auf Kan^R-Agarplatten bei 27 °C selektioniert. Durch Wechsel der Temperatur auf 37 °C konnte

das Plasmid pKD46 aus den Deletionsmutanten wieder entfernt werden (s. B.4.8). Um unerwünschte Rekombinationen im Chromosom der Bakterien ausschließen zu können, wurden die pYV Δ yop-Deletionsplasmide isoliert (s. B.4.1.2) und in einen plasmidlosen *Yersinia* Stamm (WA-C) transformiert (s. B.4.7). Des Weiteren wurde ein Resistenz markierter Vergleichstamm (WAcpYV::CM) mit der gleichen Klonierungstechnik generiert, indem eine Chloramphenicol Resistenzkassette (Cm^R-Kassette) in den nicht kodierenden Bereich des pYV-Plasmides stromaufwärts des *yadA* Gens inseriert wurde. Als Template für die Cm^R-Kassette wurde Plasmid pACYC184 (accession number X06403) verwendet. Dieser Stamm exprimiert alle Yop Proteine und zeigte sich genauso virulent wie der Wildstamm WA-314.

1.3 Temperatur und Ca²⁺ abhängiges Wachstum der *yop* Deletionsmutanten

Zur Überprüfung des Temperatur und Ca²⁺ abhängigen Wachstums der *yop* Deletionsmutanten wurden Wachstumskurven bei 37 °C in Anwesenheit von Ca²⁺ erstellt (s. B.4.9). Der Wildstamm WA-314 und die *yop* Deletionsmutanten wurden über Nacht in LB-Medium angezogen. Nach Einstellung der optischen Dichte auf einheitliche Ausgangswerte (OD₆₀₀ = 0,05) wurde nach 1, 2, 3 und 4 h das Wachstum der Stämme durch Messung der OD₆₀₀ überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die Δ YopE, Δ YopH, Δ YopO, Δ YopP und Δ YopT Mutanten ein mit WA-314 vergleichbares exponentielles Wachstum (log Phase) zeigten (Daten nicht gezeigt).

Die Stämme Δ YopM und Δ YopQ zeigten hingegen ein deutlich verlangsamtes Wachstum bei 37 °C verglichen mit WA-314 und waren dadurch für Virulenzuntersuchungen im Mausinfektionsmodell ungeeignet. Auf Grund des Temperatur sensitiven Phänotyps wurde für die Virulenzuntersuchungen eine zweite Δ YopQ Mutante mittels ET-Klonierung generiert. Dabei wurde *yopQ* ebenfalls durch eine Kan^R-Kassette ersetzt, wobei aber die ersten 150 Kodons des *yopQ*-Gens erhalten blieben. Die verwendete Δ YopM Mutante (WA-314pYV Δ M::Kan) war bereits vorhanden und verfügte über eine 1,2 kb große Kan^R-Kassette an Position 661 des *yopM* Gens. Die Mutagenese wurde mit dem Suizidvektor pGPCAT durchgeführt. Die Kan^R-Kassette aus dem Plasmid pUK4k wurde dabei nach *Pst*I-Verdau in die *Nsi*I-Schnittstelle (Sequenzposition 661) von YopM eingebaut. Das mutierte *yopM* Gen wurde in die *Sac*I-Schnittstelle von pGPCAT kloniert. Die Δ YopM Mutante exprimiert ein verkürztes YopM Protein von 25 kDa (Trülzsch *et al.*, 2001).

Beide Stämme verfügten über ein Temperatur und Ca^{2+} abhängiges Wachstum bei 37 °C vergleichbar mit WA-314 und werden im Folgenden als ΔYopM^* und ΔYopQ^* bezeichnet.

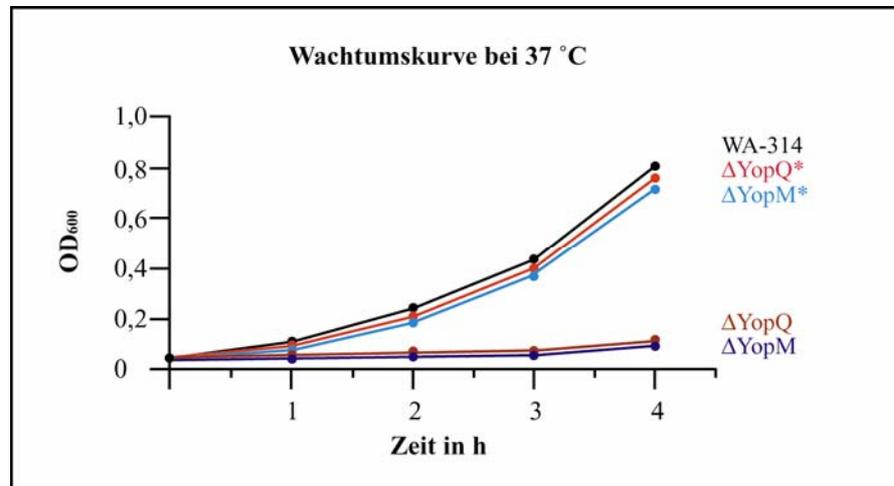


Abb. 3: Wachstumskurve bei 37 °C in Anwesenheit von Ca^{2+} : Vergleich der Wachstumskurven der *yop* Deletionsmutanten ΔYopM , ΔYopQ , ΔYopM^* und ΔYopQ^* mit dem Wildtyp WA-314 im LB-Medium bei 37 °C. Die Stämme ΔYopM und ΔYopQ zeigen einen Temperatur sensitiven Phänotyp.

1.4 Überprüfung der *yop* Deletionsmutanten im SDS-Gel und mittels Western Blot

Die Sekretion der Yop Proteine in den Kulturüberstand ermöglichte die Kontrolle der Mutationen und der korrekten Expression der nicht mutierten Yops mittels SDS-Gel und Western Blot (s. B.5.1 und B.7.1). Nach Inkubation der *yop* Deletionsstämme bei 37 °C unter Ca^{2+} -Mangel in BHI-Medium und anschließender Zentrifugation wurden die Yop Proteine mit TCA aus dem Kulturüberstand gefällt (s. B.5.3). Nach Waschen der gefällten Proteine mit Aceton und H_2O wurden diese im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Blau angefärbt (s. B.5.1). Abb. 3 zeigt das typische Bandenmuster der aus dem Kulturüberstand gefällten Yops des Wildstammes WA-314 und der *yop* Deletionsmutanten im SDS-Gel. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die Positionen der deletierten Yops der Stämme ΔYopE , ΔYopH , ΔYopM^* , ΔYopO , ΔYopP und ΔYopQ^* . Das Fehlen von YopT ist im SDS-Gel nicht erkennbar, da auf Höhe der YopT Bande das V-Antigen und YopD laufen. Die restlichen Yops werden in unveränderter Menge in den Kulturüberstand sekretiert.

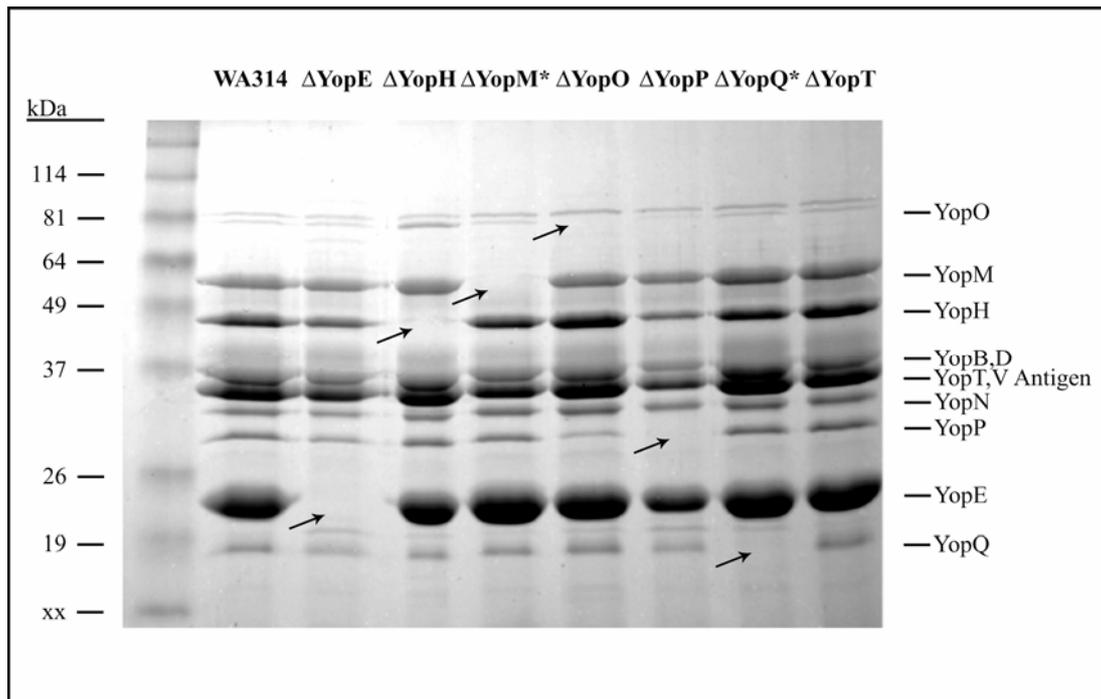


Abb. 3: Yop Proteine des *Yersinia* Stammes WA-314 und der Mutanten Δ YopE, Δ YopH, Δ YopM*, Δ YopO, Δ YopP, Δ YopQ* und Δ YopT im Coomassie gefärbten SDS-Gel: Die Stämme wurden bei 37 °C unter Ca^{2+} -Mangel in BHI-Medium angezchtet und die sekretierten Proteine aus dem Kulturüberstand gefällt. Die Positionen der fehlenden Yops sind mit Pfeil gekennzeichnet. Die übrigen Yops werden in unveränderter Menge sekretiert.

Da YopO (81,7 kDa) sowie YopQ (20,8 kDa) nur ein schwaches Signal im Coomassie gefärbten SDS-Gel geben (35,5 kDa) und YopT im SDS-Gel von YopD und V-Antigen (33 kDa und 37 kDa) überlagert wird, wurden diese Mutanten im Western Blot überprüft (s. B.7.1). Nach Auftrennung der Yops über SDS-Gel und Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran wurde ein Immunoblot mit polyklonalen Antisera gegen YopO, YopQ und YopT durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem AP gekoppelten anti-IgG Antikörper. Abb. 4 zeigt den Vergleich von WA-314 und den entsprechenden *yop* Deletionsmutanten Δ YopO, Δ YopQ* und Δ YopT im Western Blot.

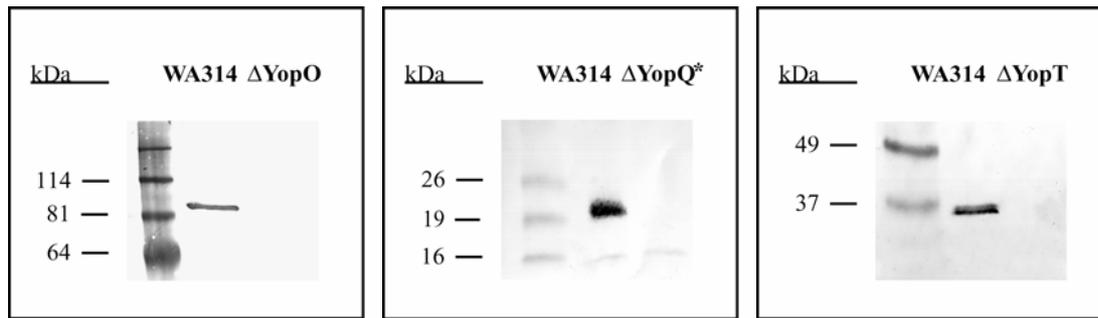


Abb. 4: Western Blot der *yop* Deletionsmutanten Δ YopO (81,7 kDa), Δ YopQ* (20,8 kDa) und Δ YopT (35,5 kDa): Nach Auftrennung der Yop Proteine über SDS-Gel wurde die Deletion des entsprechenden Yop Proteins im Immunoblot mit WA-314 verglichen. Die Detektion der Yops erfolgte mit polyklonalen anti-YopO, anti-YopQ oder anti-YopT Antiseren (1:5000) und einem AP gekoppelten anti-IgG Antikörper (1:10000).

Neben der Überprüfung der *yop* Deletionsmutanten im SDS-Gel und im Western Blot wurde die korrekte Mutation auch durch PCR und anschließender Sequenzierung kontrolliert (s. B.4.2). Eine weitere Überprüfung der *yop* Deletionsmutanten erfolgte nach Isolierung der pYV-Plasmide durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonucleasen *Hind*III und *Bam*HI. Im Agarose Gel wurde dabei das typische Bandenmuster des Wildstamm pYV-Plasmides mit denen der *yop* Deletionsmutanten nach Verdau verglichen. Dadurch konnten größere unerwünschte Rekombinationen in den pYV-Plasmiden der Mutanten ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

2. Virulenz der *yop* Deletionsmutanten im Mausinfektionsmodell

2.1 Virulenz der *yop* Deletionsmutanten nach oraler Infektion

Die Untersuchungen der *yop* Deletionsmutanten im Mausinfektionsmodell sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit die Yops einen Einfluss auf die Virulenz von *Y. enterocolitica* besitzen. Es wurden Gruppen von jeweils sechs C57Bl/6 Mäusen mit 1×10^8 CFU der *yop* Deletionsmutanten $\Delta YopE$, $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$, $\Delta YopO$, $\Delta YopP$, $\Delta YopQ^*$ und $\Delta YopT$ oder des Vergleichstammes WA-CpYV::CM oral infiziert (s. B.6.3.1). An den Tagen 2, 5, 7, 12 und 21 nach Infektion wurden die Mausgruppen getötet und die Zahl der überlebenden Bakterien als CFU im Lumen des Dünndarms, in den Peyerschen Plaques, in der Leber sowie in der Milz bestimmt (s. B.6.4). Dazu wurden Verdünnungsreihen der homogenisierten Organe auf CIN-Agar ausplattiert. Das Detektionslimit für Peyersche Plaques und Milz betrug 10 CFU. Für Leber und Dünndarm lag es bei 50 CFU pro Organ.

In den Abb. 5-9 sind die Virulenzdaten der *yop* Deletionsmutanten und des WA-CpYV::CM für die verschiedenen Zeitpunkte aufgeführt. Die Keimzahlen aus dem Lumen des Dünndarms, den Peyerschen Plaques, der Leber sowie der Milz sind als dekadischer Logarithmus der ermittelten CFU (\log_{10} CFU) dargestellt.

Zwei Tage nach oraler Infektion zeigten alle *yop* Deletionsmutanten und der Vergleichstamm WA-CpYV::CM die Fähigkeit, den Dünndarm sowie die Peyerschen Plaques zu besiedeln. Die Stämme $\Delta YopE$, $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$ und $\Delta YopO$ wiesen eine nur leichte Beeinträchtigung bei der Besiedelung dieser Organe auf. $\Delta YopP$, $\Delta YopQ^*$ und $\Delta YopT$ zeigten ähnlich hohe Keimzahlen wie WA-CpYV::CM. Leber und Milz wurden zu diesem Zeitpunkt noch von keinem Stamm kolonisiert (s. Abb. 5). Äußerliche Krankheitszeichen der Mäuse waren nicht zu erkennen.

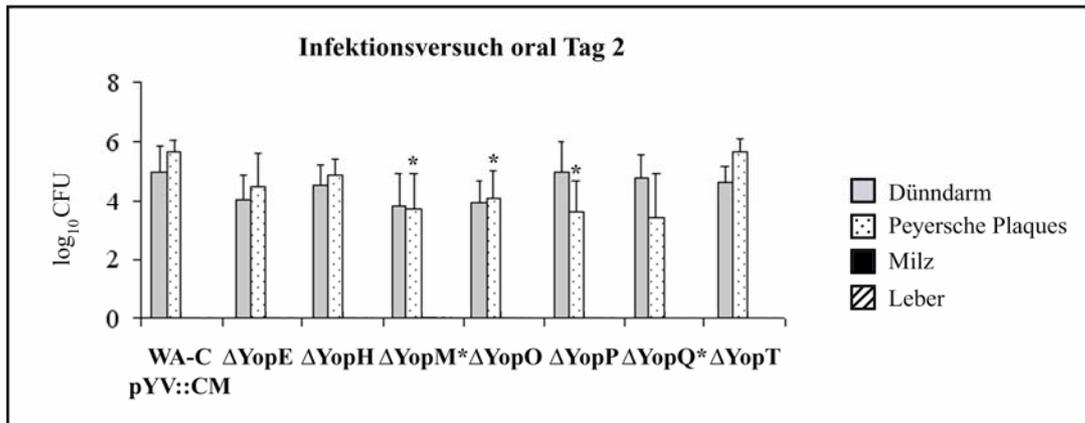


Abb. 5: Infektionsverlauf Tag 2: Dargestellt sind die \log_{10} -Titer der CFU im Lumen des Dünndarms, in den Peyerschen Plaques, der Leber sowie der Milz nach oraler Gabe von 1×10^8 CFU der *yop* Deletionsmutanten $\Delta YopE$, $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$, $\Delta YopO$, $\Delta YopP$, $\Delta YopQ^*$ und $\Delta YopT$ oder des Vergleichstammes WA-C pYV::CM. Alle Stämme waren in der Lage, den Dünndarm und die Peyerschen Plaques zu besiedeln. Leber und Milz wurden zu diesem Zeitpunkt von keinem Stamm kolonisiert. Sternchen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen der Besiedelung mit WA-CpYV::CM und den *yop* Deletionsmutanten.

Deutliche Unterschiede in der Virulenz der *yop* Deletionsmutanten wurden an Tag fünf sichtbar. Während die Infektion mit WA-CpYV::CM und den Mutanten $\Delta YopE$, $\Delta YopO$, $\Delta YopP$ und $\Delta YopT$ progredient verlief und zu einer systemischen Infektion mit Abzessbildung in Leber und Milz führte, waren die Stämme $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$ und $\Delta YopQ^*$ so stark attenuiert, dass keine Bakterien in Leber und Milz nachweisbar waren. $\Delta YopO$ und $\Delta YopT$ zeigten ähnlich hohe Keimzahlen wie WA-CpYV::CM, wohingegen für $\Delta YopE$ und $\Delta YopP$ signifikant geringere Keimzahlen in allen vier Organen ermittelt wurden (s. Abb. 6).

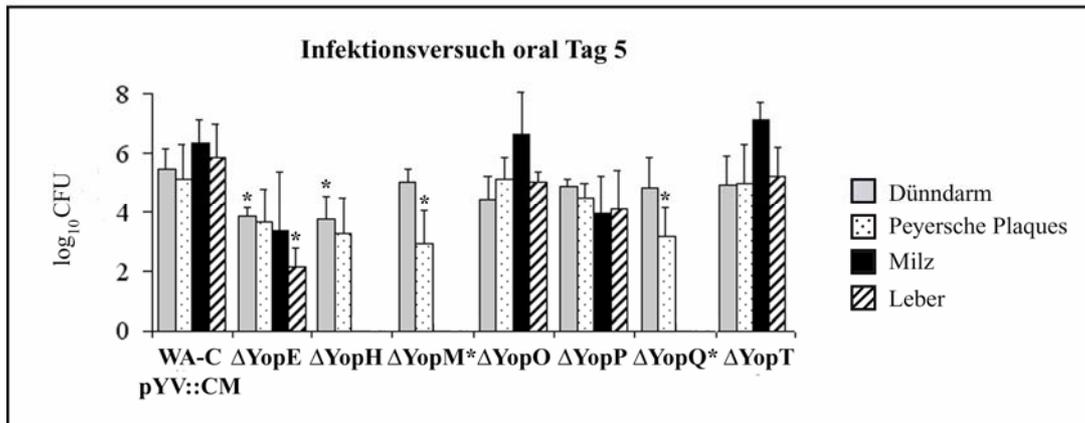


Abb. 6: Infektionsverlauf Tag 5: Die Infektion mit den Stämmen $\Delta YopE$, $\Delta YopO$, $\Delta YopP$, $\Delta YopT$ und mit WA-CpYV::CM war fortschreitend und führte zu einem systemischen Verlauf der Infektion mit der Besiedelung von Leber und Milz. Die mit $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$ und $\Delta YopQ^*$ infizierten Mäuse wiesen Bakterien im Lumen des Dünndarms und den Peyerschen Plaques auf. Diese Stämme waren aber in ihrer Virulenz so stark abgeschwächt, dass sie weder die Leber noch die Milz kolonisieren konnten.

Der Infektionsgipfel mit der höchsten Zahl an Bakterien war an Tag sieben erreicht. Die mit WA-CpYV::CM oder den Stämmen $\Delta YopE$, $\Delta YopO$, $\Delta YopP$ oder $\Delta YopT$ infizierten Mäuse zeigten schwere Krankheitszeichen und hohe Keimzahlen in allen Organen (s. Abb. 7). Die Besiedelung mit den Stämmen $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$ und $\Delta YopQ^*$ war nicht fortschreitend und blieb auf den Dünndarm und die Peyerschen Plaques begrenzt.

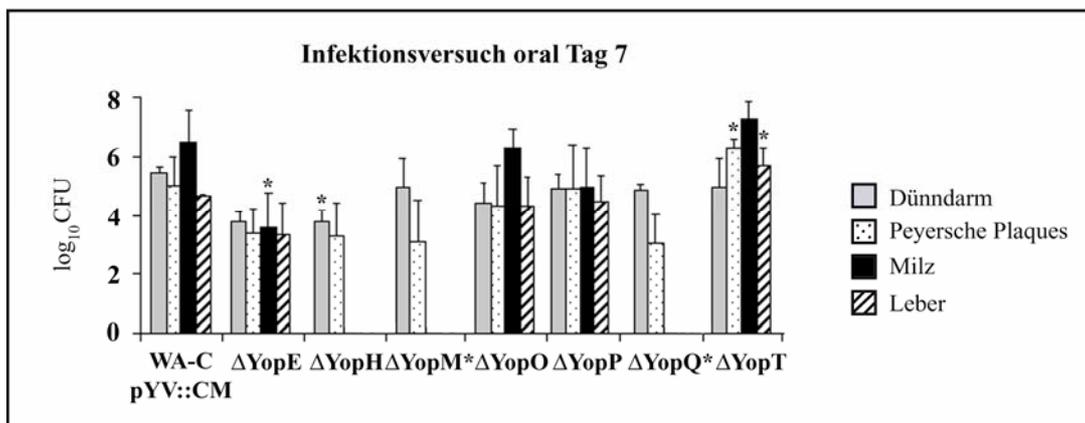


Abb. 7: Infektionsverlauf Tag 7: Die Infektion mit den Stämmen $\Delta YopE$, $\Delta YopO$, $\Delta YopP$, $\Delta YopT$ oder WA-CpYV::CM führte an Tag sieben zu den höchsten Keimzahlen in Leber und Milz. Die Besiedelung der Mäuse mit $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$ und $\Delta YopQ^*$ löste dagegen keine systemische Infektion aus und blieb auf den Dünndarm und die Peyerschen Plaques beschränkt.

Zwischen den Tagen sieben und zwölf starb ein Großteil der Mäuse, die mit WA-CpYV::CM oder den Stämmen Δ YopO und Δ YopT infiziert waren, auf Grund des systemischen Verlaufs der Infektion und der hohen Bakterienzahl in den Organen.

An Tag 12 zeigte sich dann eine deutliche Reduktion der Keimzahlen für die verbliebenen Mutanten. Die Infektion mit Δ YopE und Δ YopP konnte von den Mäusen kontrolliert werden und führte zur Elimination der Bakterien aus Leber und Milz.

Die Besiedelung der Mäuse durch die Mutanten Δ YopE, Δ YopM*, Δ YopP und Δ YopQ* beschränkte sich dabei auf den Dünndarm und die Peyerschen Plaques. Der Δ YopH Stamm kolonisierte an Tag 12 den Dünndarm, war aber nicht mehr in den Peyerschen Plaques nachweisbar (s. Abb. 8).

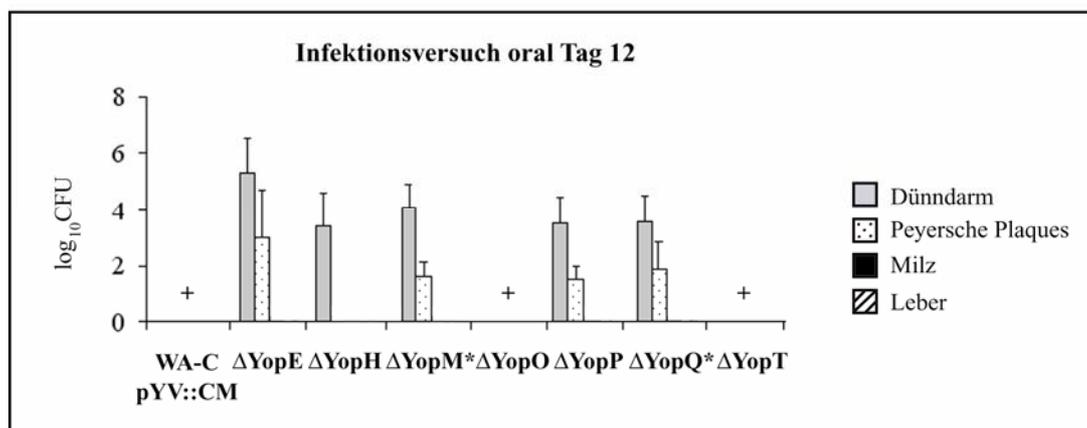


Abb. 8: Infektionsverlauf Tag 12: Auf Grund der hohen Keimzahlbelastung durch Δ YopO, Δ YopT oder WA-CpYV::CM führte die Infektion mit diesen Stämmen zwischen Tag 7 und Tag 12 zum Tod der Mäuse. Die Infektion durch die Stämme Δ YopE und Δ YopP konnte von den Mäusen kontrolliert werden und ermöglichte die Elimination der Bakterien aus Leber und Milz. Neben Δ YopE und Δ YopP besiedelten auch Δ YopM* und Δ YopQ* den Dünndarm und die Peyerschen Plaques. Die Besiedelung mit Δ YopH beschränkte sich auf den Dünndarm. Die für Mäuse letalen Stämme sind mit Kreuz (+) gekennzeichnet.

Auch drei Wochen nach Infektion konnten Δ YopH, Δ YopM* und Δ YopQ* noch aus dem Dünndarm reisoliert werden, während die Peyerschen Plaques keine anzüchtbaren Yersinien aufwiesen. Δ YopP war zu diesem Zeitpunkt sowohl im Dünndarm als auch in den Peyerschen Plaques nachweisbar. Die Infektion mit Δ YopE schien vollständig ausgeheilt, da keine Bakterien mehr aus dem Dünndarm sowie den Peyerschen Plaques reisoliert werden konnten (s. Abb. 9).

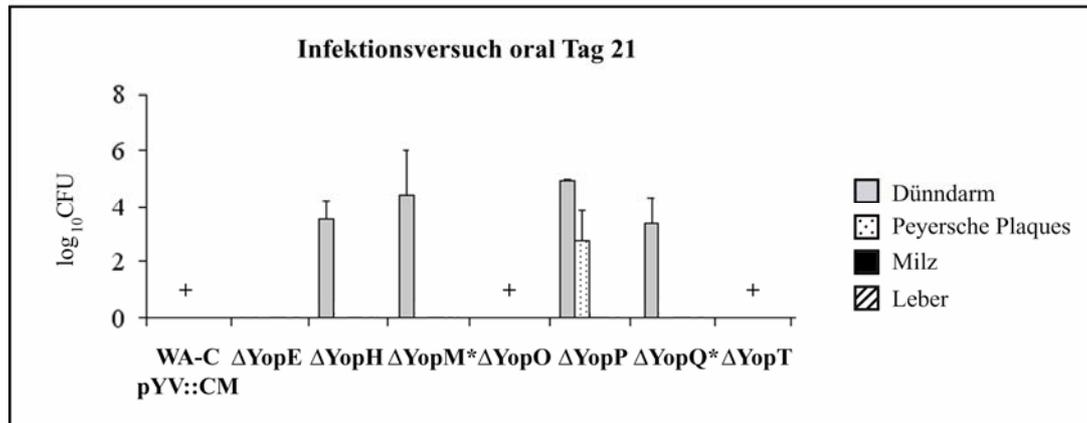


Abb. 9: Infektionsverlauf Tag 21: Die Stämme $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$ und $\Delta YopQ^*$ waren drei Wochen nach Infektion nur noch im Dünndarm nachweisbar. Der Stamm $\Delta YopP$ besiedelte neben dem Dünndarm auch die Peyerschen Plaques. Die Infektion mit $\Delta YopE$ zeigte zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Keimzahlen im Dünndarm sowie den Peyerschen Plaques.

2.2 Virulenz der *yop* Deletionsmutanten nach i.v. Infektion

Die Virulenzuntersuchungen mit den *yop* Deletionsmutanten und dem Vergleichstamm WA-CpYV::CM wurden auch im intravenösen Infektionsmodell durchgeführt. Der Vergleich der oralen und der intravenösen Infektionsdaten sollte Aufschluss darüber geben, ob die Attenuierung einiger *yop* Deletionsmutanten nur infolge einer oralen Applikation auftritt. Das intravenöse Infektionsmodell führt direkt zu einer systemischen Infektion unter Umgehung des Gastrointestinaltraktes (GIT) der Maus. Im Vergleich zu den oralen Virulenzdaten sollten dadurch mögliche Einflüsse der Yops auf die Invasion in den Wirtsorganismus zu Beginn einer Infektion erkennbar werden. Es wurden Gruppen von jeweils sechs C57Bl/6 Mäusen mit einer Dosis von 4×10^4 CFU mit den *yop* Deletionsmutanten und WA-CpYV::CM i.v. infiziert (s. B.6.3.2). An den Tagen zwei und vier wurden Leber und Milz entnommen und die Keimzahlen durch Verdünnungsreihen der homogenisierten Organe auf CIN-Agar bestimmt (s. B.6.4).

Der Vergleichstamm WA-CpYV::CM wies an Tag zwei hohe Keimzahlen in Leber und Milz auf ($4,88 \pm 0,37$ und $6,53 \pm 0,40$ log₁₀ CFU) mit einem fortschreitenden Infektionsverlauf bis Tag vier ($5,73 \pm 0,32$ und $8,33 \pm 0,54$ log₁₀ CFU).

Schon an Tag zwei zeigte eine Infektion mit $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$ und $\Delta YopQ^*$ trotz gleicher Dosierung wesentlich niedrigere Keimzahlen in Leber und Milz.

Die größte Attenuierung wies dabei $\Delta YopH$ mit einer 2100-fachen Reduktion der CFU in der Milz verglichen mit WA-CpYV::CM auf. Die Keimzahlen der Milz für $\Delta YopQ^*$ waren um den Faktor 100 und für $\Delta YopM$ um den Faktor 13 verringert. Die Stämme $\Delta YopE$ und $\Delta YopP$ (Reduktion um den Faktor 4,7 bzw. 2) waren im Vergleich zu WA-CpYV::CM nicht signifikant attenuiert ($P > 0,05$). Infektion mit $\Delta YopT$ hingegen führte zu einer 7-fachen Erhöhung der Keimzahlen in der Milz an Tag 2 (s. Abb. 10).

An Tag vier zeigten die Virulenzdaten eine deutliche Progression des Infektionsverlaufs für die Stämme $\Delta YopE$, $\Delta YopM^*$, $\Delta YopO$, $\Delta YopP$, $\Delta YopT$ und WA-CpYV::CM. Die Keimzahlen der Milz waren im Vergleich zu Tag zwei um den Faktor 4,3 bei $\Delta YopE$, 17 bei $\Delta YopM^*$, 229 bei $\Delta YopO$, 18 bei $\Delta YopT$, 4 bei $\Delta YopP$ und 63 bei WA-CpYV::CM erhöht, wohingegen die CFU der $\Delta YopH$ Mutante um den Faktor 40 reduziert waren. Verglichen mit WA-CpYV::CM zeigte $\Delta YopH$ vier Tage nach Infektion eine Attenuierung um den Faktor $2,19 \times 10^5$, $\Delta YopQ^*$ um den Faktor $6,3 \times 10^3$ und $\Delta YopM^*$ um den Faktor 50. $\Delta YopE$ und $\Delta YopP$ waren um den Faktor 63 in ihrer Virulenz abgeschwächt. $\Delta YopO$ war nur schwach attenuiert (Faktor 2,7), wohingegen $\Delta YopT$ höhere Keimzahlen in Leber (Faktor 28) und Milz (Faktor 1,4) als der Vergleichstamm WA-CpYV::CM aufwies (s. Abb. 11).

Die Keimzahlen der mit *yop* Deletionsmutanten oder mit WA-CpYV::CM infizierten Mäuse waren in der Leber um den Faktor 10-100 niedriger als in der Milz, ohne das hierbei ein besonderer Einfluss einzelner Yops erkennbar gewesen wäre.

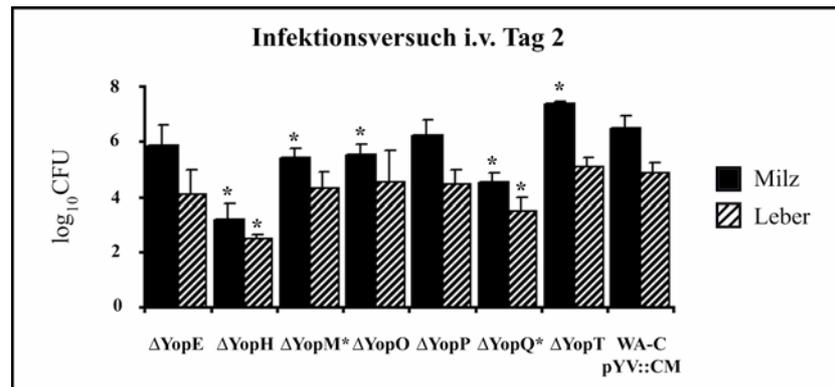


Abb. 10: i.v. Infektion Tag 2: Virulenzdaten der *yop* Deletionsmutanten $\Delta YopE$, $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$, $\Delta YopO$, $\Delta YopP$, $\Delta YopQ^*$, $\Delta YopT$ und WA-CpYV::CM an Tag 2 nach i.v. Infektion mit 4×10^4 CFU. Dargestellt sind die \log_{10} -Titer der CFU in Leber und Milz. Die Stämme $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$ und $\Delta YopQ^*$ zeigten eine Reduktion der Keimzahlen im Vergleich zu WA-CpYV::CM. Sternchen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen der Besiedelung mit WA-CpYV::CM und den *yop* Deletionsmutanten.

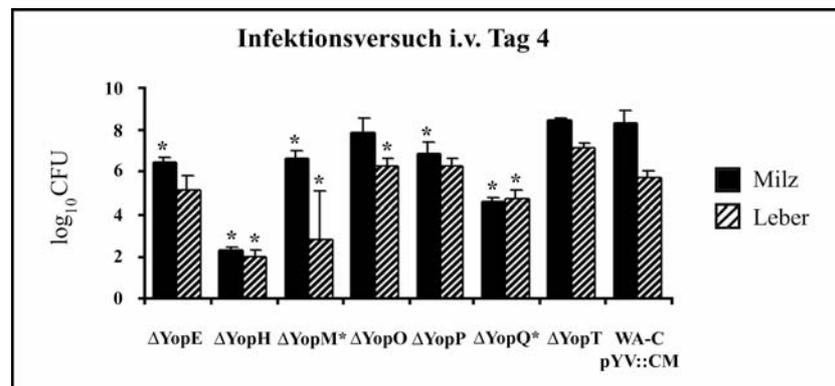


Abb. 11: i.v. Infektion Tag 4: Die Infektion mit den Stämmen $\Delta YopE$, $\Delta YopM^*$, $\Delta YopO$, $\Delta YopP$, $\Delta YopT$ sowie mit WA-CpYV::CM verlief progredient und führte zu erhöhten Keimzahlen an Tag 4. Die höchsten CFU in Leber und Milz wiesen WA-CpYV::CM, $\Delta YopO$ und $\Delta YopT$ auf. Die Stämme $\Delta YopE$, $\Delta YopM^*$ und $\Delta YopP$ zeigten etwas geringere, die Stämme $\Delta YopH$ und $\Delta YopQ^*$ deutlich niedrigere CFU in beiden Organen. Sternchen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen der Besiedelung mit WA-CpYV::CM und den *yop* Deletionsmutanten.

2.3 Virulenzvergleich Δ YopT und WA-CpYV::CM im kompetitiven Ansatz

Die Auswertungen der Daten aus den oralen (s. C.2.1) und den i.v. (s. C.2.2) Virulenzversuchen zeigten, dass an verschiedenen Zeitpunkten höhere Keimzahlen für die Δ YopT Mutante als für den Vergleichstamm WA-CpYV::CM ermittelt wurden. Dies lässt vermuten, dass YopT einen hemmenden Einfluss auf die Virulenz von *Y. enterocolitica* besitzen könnte. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden Gruppen von 6 C57Bl/6 Mäusen mit 1×10^8 CFU einer 1:1 Mischung der Stämme Δ YopT und WA-CpYV::CM i.v. infiziert und die Keimzahlen am Tag zwei nach Infektion in Leber und Milz bestimmt (s. B.6.3.2 und B.6.4). Dabei zeigte sich, dass die Keimzahlen der Δ YopT Mutante in der Leber um 1,18 \log_{10} CFU höher waren als die des Vergleichstammes WA-CpYV::CM (Δ YopT $\log_{10} 4,23 \pm 0,99$ CFU; WA-CpYV::CM $\log_{10} 3,05 \pm 1,03$ CFU; $P = 0,0075$). In der Milz fiel dieser Unterschied mit $\log_{10} 6,61 \pm 0,36$ CFU für Δ YopT und $\log_{10} 6,49 \pm 0,34$ CFU für WA-CpYV::CM wesentlich geringer aus.

2.4 Komplementierung der Δ YopH Mutante

Zur Komplementierung der am stärksten attenuierten Mutante wurde ein „low copy“ Plasmid (pYopHSyCH) mit den Genen für YopH und SyCH verwendet. Das Plasmid pYopHSyCH war bereits vorhanden und verfügt über die Gene *yopH* und *syCH*, die über eine *HindIII* Schnittstelle in den Vektor pACYC184 kloniert sind (Truelzsch et al., 2003). Nach Transformation dieses Plasmides (s. B.4.7) in die Δ YopH Mutante wurde die korrekte Expression und die Sekretion der Yops in den Kulturüberstand kontrolliert (s. B.5.3). Der komplementierte Stamm Δ YopH+pYopHSyCH, die Δ YopH Mutante und der Vergleichstamm WA-CpYV::CM wurden unter Sekretionsbedingungen (37 °C, Ca^{2+} -Mangel, BHI-Medium) angezüchtet und die Yops nach Fällung mit TCA aus dem Kulturüberstand über SDS-Gel aufgetrennt (s. B.5.1). Im Vergleich zur Δ YopH Mutante wies der komplementierte Stamm Δ YopH+pYopHSyCH die entsprechende YopH Bande bei 51 kDa im Coomassie gefärbten SDS-Gel auf. Auf Grund der starken Expression von YopH durch das Plasmid pYopHSyCH kam es zu einer verringerten Sekretion der übrigen Yop Proteine (s. Abb. 12).

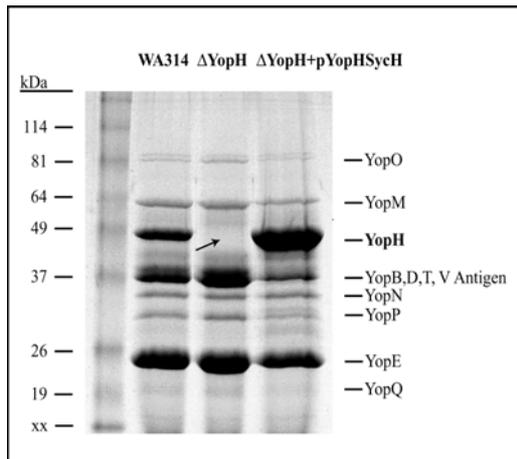


Abb. 12: Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Stämme WA-CpYV::CM, ΔYopH und ΔYopH+pYopHSycH: Die Stämme wurden unter Sekretionsbedingungen (37 °C, Ca²⁺-Mangel, BHI-Medium) angezchtet und die gefällten Yops über SDS-Gel aufgetrennt. Der komplementierte Stamm sekretierte das YopH Protein von Plasmid pYopHSycH in den Kulturüberstand und wies die entsprechende Bande bei 51 kDa auf. Die fehlende YopH Bande ist mit Pfeil gekennzeichnet.

Zur Bestätigung der Funktionsfähigkeit von YopH nach Komplementierung wurde die Virulenz von ΔYopH+pYopHSycH, ΔYopH und WA-CpYV::CM im oralen Mausinfektionsmodell untersucht (s. B.6.3.1). Fünf Tage nach Infektion von Gruppen mit je 6 C57Bl/6 Mäusen mit 1x10⁸ CFU wurden die Keimzahlen im Lumen des Dünndarms, den Peyerschen Plaques, der Leber und der Milz bestimmt (s. B.6.4). Im Gegensatz zur stark attenuierten ΔYopH Mutante führte die Infektion mit dem komplementierten Stamm ΔYopH+pYopHSycH zu einem systemischen Verlauf mit Kolonisierung von Leber und Milz vergleichbar mit WA-CpYV::CM. Das Plasmid pYopHSycH konnte die ΔYopH Mutante im oralen Infektionsmodell erfolgreich komplementieren (s. Abb. 13).

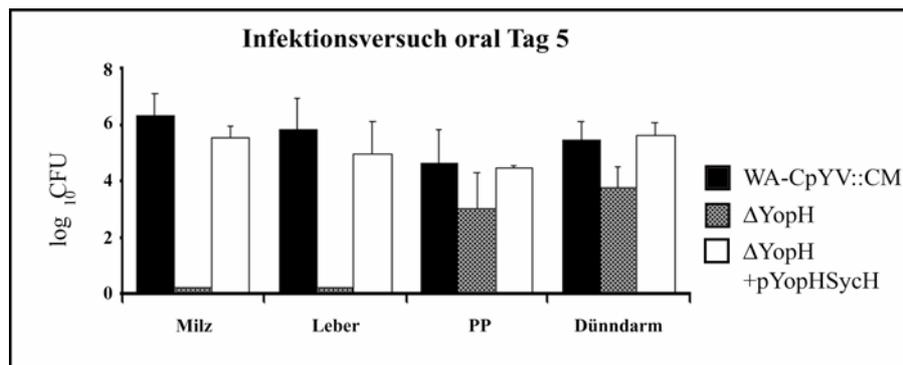


Abb. 13: Komplementierung der ΔYopH Mutante im Virulenzversuch: Virulenzdaten der Stämme ΔYopH+pYopHSycH, ΔYopH und WA-CpYV::CM an Tag 5 nach oraler Infektion mit 1x10⁸ CFU. Die Infektion mit ΔYopH+pYopHSycH führte zur Besiedelung von Leber und Milz vergleichbar mit WA-CpYV::CM.

3. Humorale Immunantwort auf yop Deletionsmutanten

3.1 Spezifische Antikörperantwort auf Yop Überstandsproteine

3.1.1 Detektion mittels ELISA

Die Virulenzdaten aus den Mausinfektionsversuchen ließen vermuten, dass das Fehlen einzelner Yops möglicherweise auch einen Einfluss auf die Immunantwort in Mäusen besitzt. Die Untersuchung der humoralen Immunantwort wurde mit den attenuierten Stämmen $\Delta YopE$, $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$, $\Delta YopP$ und $\Delta YopQ^*$ im Vergleich zu einer $\Delta SodA$ Mutante (WA-C(pYV) $\Delta sodA$) durchgeführt. Der Vergleichstamm $\Delta SodA$ weist eine Kan^R-Kassette innerhalb des *sodA*-Gens auf und ist dadurch in seinen Virulenzeigenschaften soweit abgeschwächt, dass die Infektion auf den Dünndarm und die Peyerschen Plaques begrenzt bleibt. Die $\Delta SodA$ Mutante verfügt als Positivkontrolle über sämtliche Yop Proteine (Roggenkamp *et al.*, 1997; Igwe *et al.*, 1999). Die Stämme $\Delta YopO$, $\Delta YopT$ sowie WA-CpYV::CM eigneten sich nicht für immunologische Untersuchungen, da sie zwischen Tag fünf und Tag sieben nach Infektion zum Tod der Mäuse führten (s. C.2.1).

Um die humorale Immunantwort der Maus nach Infektion mit *yop* Deletionsmutanten gegen Yop-Antigene zu untersuchen und um etwaige Unterschiede in der Fähigkeit der Antikörperbildung festzustellen, wurden Gruppen von je 6 C57Bl/6 Mäusen mit einer Dosis von 1×10^8 CFU oral infiziert (s. B.6.3.1). An den Tagen 12, 21, 35 und 90 nach Infektion wurde Serum abgenommen (s. B.6.5) und die klassenspezifische Antikörperantwort (IgA, IgG und IgM) in einem Yop spezifischen ELISA gemessen (s. B.7.3).

Die in Abb. 14 gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass alle untersuchten Stämme zur Bildung spezifischer Antikörper gegen Yops führen. Die höchsten IgA und IgM Titer wurden an Tag 12 und an Tag 21 gemessen, die IgG Titer wiesen die höchsten Werte an Tag 21 und Tag 35 auf. Nach Tag 21 fielen die Werte der IgA und IgM Antikörper kontinuierlich ab. Die IgG Antikörpertiter sanken bis Tag 90 nur leicht ab. Ein Vergleich der *yop* Deletionsmutanten mit $\Delta SodA$ zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Yop-Antikörpertiter. Ein besonderer Einfluss einzelner Yops auf die Antikörperantwort in der Maus konnte somit nicht festgestellt werden. Trotz Begrenzung der Infektion auf den Dünndarm und die Peyerschen

Plaques (s. B.2.1) lösten $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$, $\Delta YopQ^*$ sowie $\Delta SodA$ eine gute humorale Immunantwort aus.

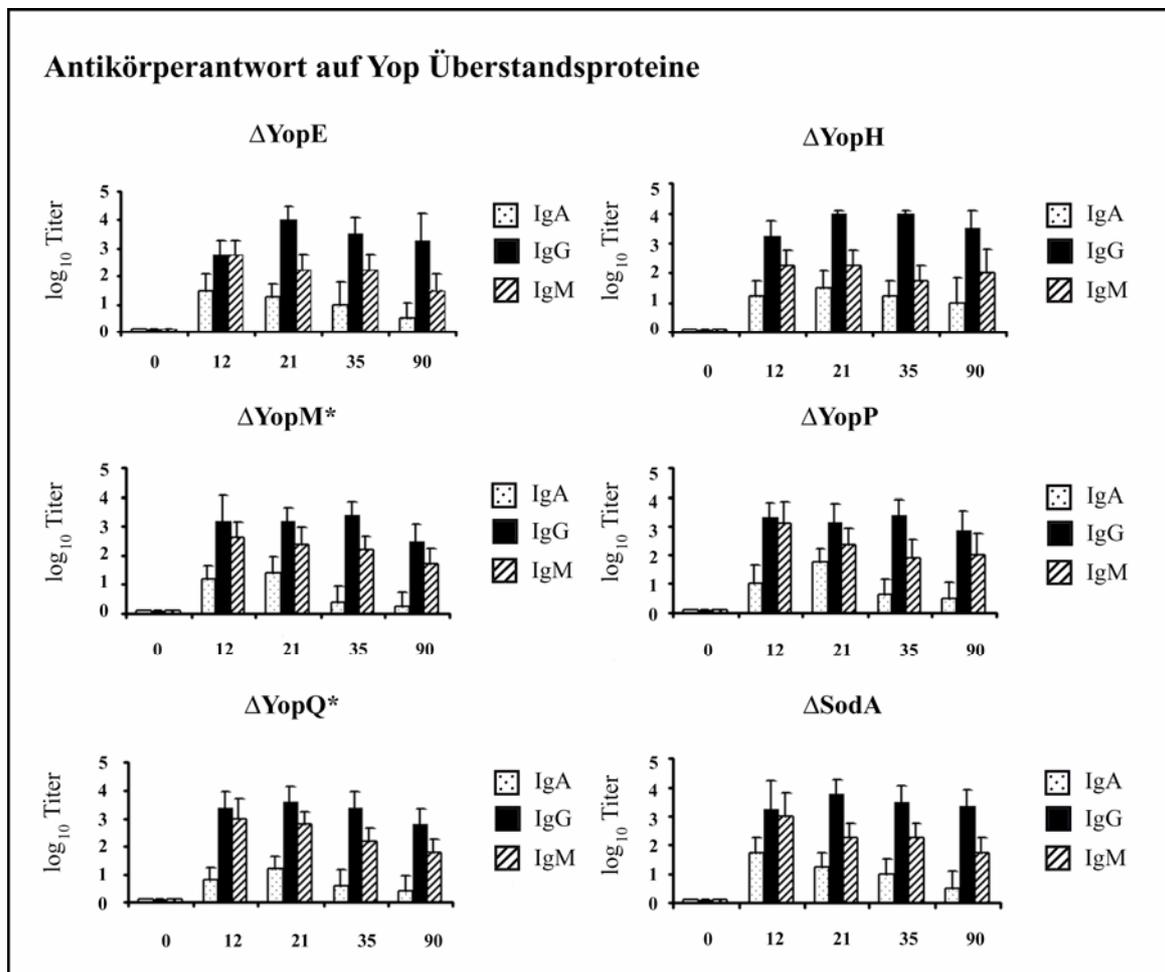


Abb. 14: Humorale Immunantwort gegen sezernierte Yops: Dargestellt sind die Ergebnisse der klassenspezifischen Immunantwort (IgA, IgM und IgG) der infizierten C57Bl/6 Mäuse auf Yop Proteine aus Kulturüberstand. Die Mäuse wurden oral (1×10^8 CFU) mit $\Delta YopE$, $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$, $\Delta YopP$, $\Delta YopQ^*$ und dem Vergleichstamm $\Delta SodA$ infiziert. Die Antikörpertiter sind dargestellt als \log_{10} der letzten Verdünnungsstufe der Seren, die einen signifikanten Unterschied von $0,1 OD_{405}$ im Vergleich zur Negativkontrolle (Serum einer nicht infizierten Maus) ergibt.

3.1.2 Detektion mittels Western Blot

Die Serum Antikörperantwort, ausgelöst durch die verschiedenen *yop* Deletionsmutanten, wurde auch im Western Blot (s. B.7.1) untersucht, um herauszufinden gegen welche Yop Proteine sich die humorale Immunantwort der oral infizierten Mäuse genau richtete. Die Yop Überstandsproteine (s. B.5.3) wurden im SDS-Gel aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine

Nitrocellulosemembran transferiert. Zur Bestimmung der spezifischen IgG Antikörper wurden die Blots mit Seren (1:100), die am Tag 21 nach Infektion mit Δ YopE, Δ YopH, Δ YopM*, Δ YopP, Δ YopQ* und Δ SodA genommen wurden, inkubiert. Als zweiter Antikörper diente ein HRP gekoppelter anti-IgG Ak (1:10000). Der Western Blot in Abb. 15 zeigt die IgG-Antikörperantwort ausgelöst durch *yop* Deletionsmutanten im Vergleich zu Δ SodA und einem Serum einer nicht infizierten Maus (Null-Serum). Es konnte gezeigt werden, dass einige der Yops zur Auslösung einer spezifischen Antikörperantwort führen. Im Vergleich mit einem Null-Serum wies das Serum Δ SodA infizierter Mäuse eine starke Immunogenität für die Proteine YopO (81,7 kDa), YopD/V-Antigen (33,4 kDa und 37kDa) und YopP (32,5 kDa) auf. Eine schwache IgG-Antikörperantwort auf die Proteine YopH, YopM und YopE konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Auch die Seren der untersuchten *yop* Deletionsmutanten zeigten die Bildung spezifischer IgG-Antikörper gegen die Proteine YopO, YopD/V-Antigen und YopP und eine schwächere Antikörperbildung gegen YopM, YopH und YopE. Die entsprechende Bande des deletierten Yops fehlte (s. Abb. 15 Δ YopP).

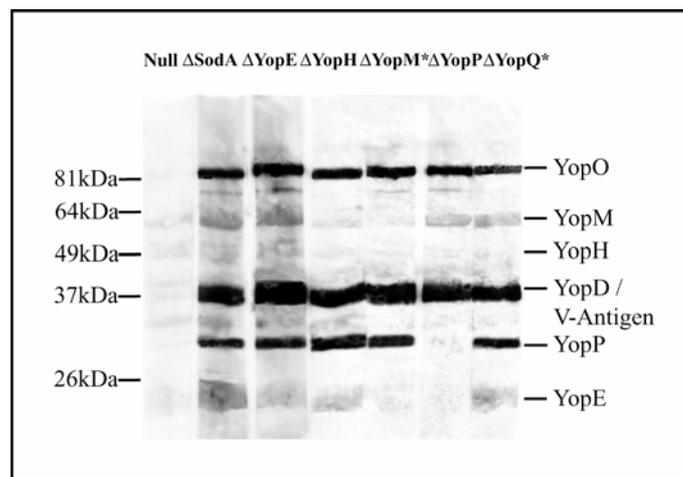


Abb. 15: Western Blot mit Seren der *yop* Deletionsmutanten im Vergleich zur Δ SodA Mutante und einem Serum einer nicht infizierten Maus (Null-Serum). Die Yop Proteine stammten aus dem Kulturüberstand einer WA-314 Bakterienkultur (BHI-Medium, 37 °C, Ca²⁺-Mangel). Seren wurden 1:100 verdünnt, der HRP gekoppelte anti-IgG Ak 1:10000. Eine starke Immunogenität besitzen die Proteine YopO (81,7 kDa), YopD/V-Antigen (33,4 kDa und 37 kDa) und YopP (32,5 kDa).

4. Phagozytose von *yop* Deletionsmutanten durch dendritische Zellen

Einige der Yop Effektorproteine interagieren mit dem Zytoskelett eukaryontischer Zellen und vermitteln so Resistenz gegen Phagozytose durch Makrophagen und PMNs (Grosdent *et al.*, 2002). Mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenz wurde der Einfluss der Yop Effektorproteine auf die Phagozytose durch dendritische Zellen (DC) untersucht (s. B.7.5.1). 3 h nach Infektion der DCs mit einer MOI von 10 mit Δ YopE, Δ YopH, Δ YopM*, Δ YopO, Δ YopP, Δ YopQ*, Δ YopT oder WA-CpYV::CM wurde die Anzahl extrazellulärer und phagozytierter Bakterien ermittelt. Die Phagozytoserate wurde als Anteil der phagozytierten Bakterien an der Gesamtzahl der mit den dendritischen Zellen assoziierten Bakterien bestimmt (s. Abb. 16).

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (s. Abb. 17) machen deutlich, dass die *yop* Deletionsmutanten Δ YopE, Δ YopH, Δ YopO und Δ YopT, deren deletierte Effektorproteine an der Modulation des Zytoskelettes beteiligt sind, eine erhöhte Phagozytoserate aufweisen. So werden die Mutanten Δ YopE (44 %), Δ YopH (46 %), Δ YopO (39 %) und Δ YopT (40 %) signifikant stärker phagozytiert als WA-CpYV::CM (17 %). Der Prozentsatz phagozytierter Bakterien nach Infektion mit Δ YopM* (19 %), Δ YopP (22 %) und Δ YopQ* (22 %) war im Vergleich zu WA-CpYV::CM nicht signifikant erhöht.

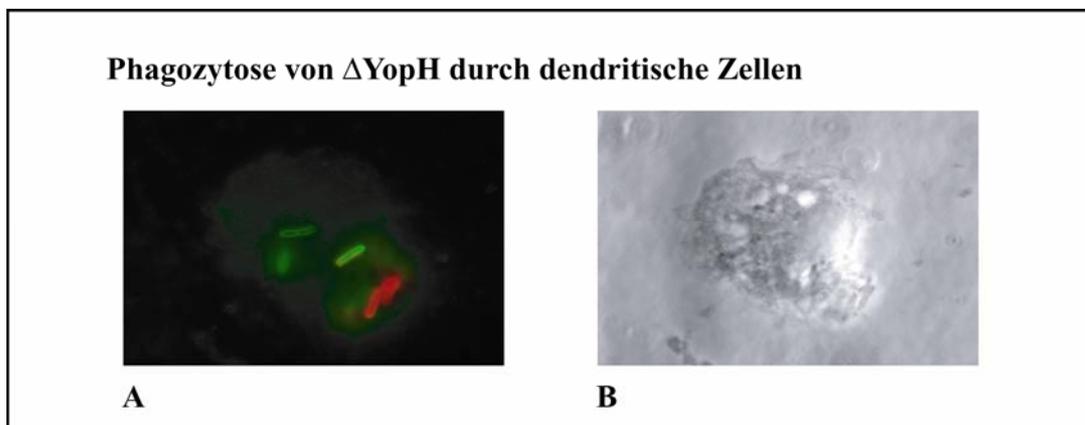


Abb. 16: Phagozytose von Δ YopH durch dendritische Zellen: A: Fluoreszenzmikroskopie: Extrazelluläre Bakterien sind rot (TRITC), intrazelluläre Bakterien grün (FITC) markiert. B: Phasenkontrast

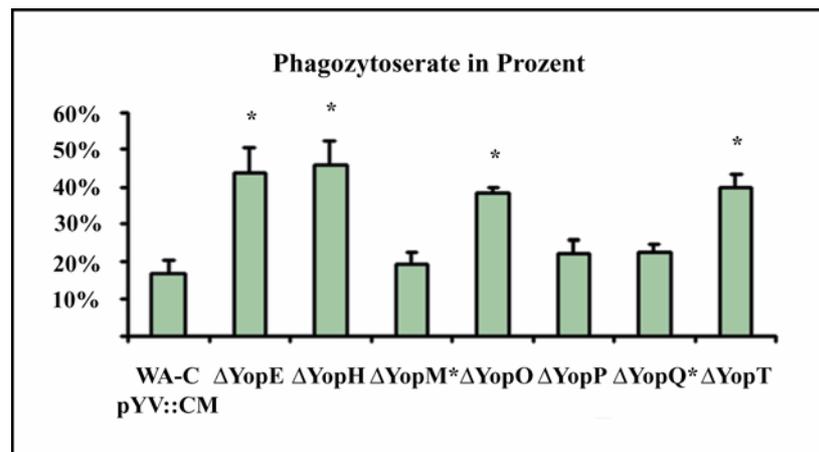


Abb. 17: Phagozytoserate der *yop* Deletionsmutanten durch dendritische Zellen: Die Phagozytoserate wurde als Prozentsatz der phagozytierten Bakterien an der Gesamtzahl der mit dendritischen Zellen assoziierten Bakterien bestimmt. Die *yop* Deletionsmutanten $\Delta YopE$, $\Delta YopH$, $\Delta YopO$ und $\Delta YopT$ wurden signifikant stärker phagozytiert als WA-CpYV::CM. Nach Infektion mit den Mutanten $\Delta YopM^*$, $\Delta YopP$ und $\Delta YopQ^*$ konnte kein Einfluss auf die Phagozytoserate festgestellt werden. Sternchen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied der *yop* Deletionsmutanten im Vergleich zu WA-CpYV::CM.

5. Sekretion und Translokation eines heterologen Antigens

5.1 Sekretion und Translokation von YopE Fusionsproteinen durch *yop* Deletionsmutanten

Das TTSS von *Y. enterocolitica* ist nicht nur in der Lage Yop Effektorproteine zu translozieren, sondern kann darüber hinaus auch genutzt werden, um heterologe Antigene in das Zytosol eukaryontischer Zellen zu translozieren (Sory *et al.*, 1992). Verschiedene *in vitro* Untersuchungen haben dabei das Potential von YopE als Transporter für Fremdanigene beschrieben (Sory *et al.*, 1990, Rüssmann *et al.*, 2000).

Zur weiteren Charakterisierung der *yop* Deletionsmutanten und zur Untersuchung der humoralen und der zellulären Immunantwort auf ein heterologes Antigen, wurden die *yop* Deletionsmutanten mit zwei unterschiedlichen YopE Fusionsproteinen ausgestattet (s. Abb. 18).

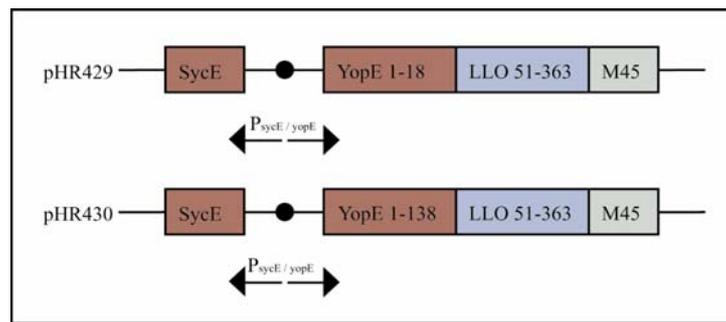


Abb. 18: Schematische Darstellung der Plasmide pHR429 und pHR430: Das Plasmid pHR429 enthält nur die Sekretionsdomäne und kodiert für die N-terminalen AS 1-18 von YopE. Das Plasmid pHR430 beinhaltet die genetische Information für die AS 1-138 und verfügt sowohl über die Sekretions- als auch über die Translokationsdomäne von YopE. Beide YopE Fragmente sind fusioniert mit AS 51-363 von Listeriolysin O (LLO₅₁₋₃₆₃). Das M45-Epitop am C-terminalen Ende des Fusionsproteins dient der Detektion durch M45 mAk.

5.1.1 *In vitro* Expression und Sekretion von YopE Fusionsproteinen

Die *yop* Deletionsmutanten Δ YopE, Δ YopH, Δ YopM*, Δ YopP und Δ YopQ* wurden mit den Plasmiden pHR429 und pHR430 transformiert. Darüber hinaus wurde die Δ SodA Mutante mit pHR429 und pHR430 und eine Δ SodA Δ YopP Doppelmutante mit pHR430 transformiert (s. B.4.7). Δ SodA Δ YopP wurde durch Transformation von pYV Δ yopP::Cm in einen plasmidlosen Δ SodA Stamm erhalten. Expression und Sekretion der Fusionsproteine in den Kulturüberstand wurden im Western Blot bestätigt (s. B.7.1). Dazu wurden die Transformanten unter Sekretionsbedingungen angezchtet (s. B.5.3). Die mit TCA gefällten Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Detektion der Fusionsproteine YopE₁₋₁₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 (pHR429) und YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 (pHR430) erfolgte mit einem anti-M45 IgG mAk (1:1000) und einem anti-IgG HRP gekoppelten Zweitantikörper (1:5000). Die Sekretion des jeweiligen Fusionsproteins in den Kulturüberstand konnte sowohl für pHR429 als auch für pHR430 mit allen Transformanten nachgewiesen werden (s. Abb. 19 und Abb. 20).

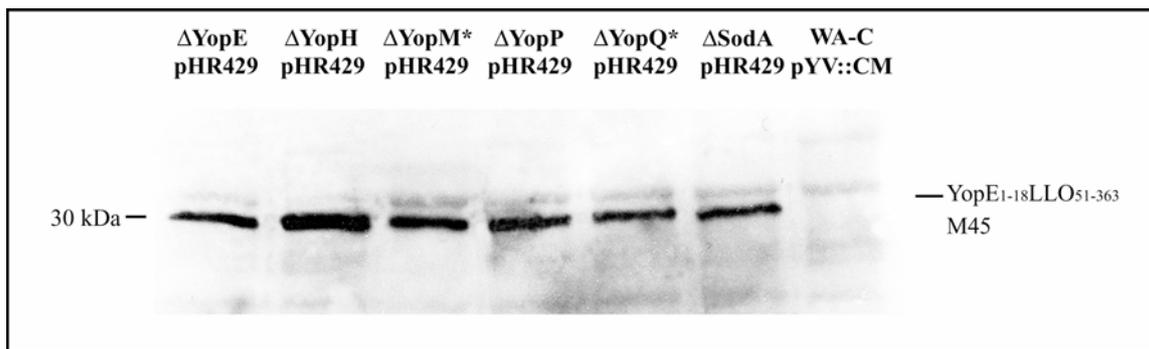


Abb. 19: Sekretion des Fusionsproteins YopE₁₋₁₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 in den Kulturüberstand: Sekretion erfolgte mit den Mutanten Δ YopE, Δ YopH, Δ YopM*, Δ YopP, Δ YopQ* und Δ SodA nach Transformation mit pHR429. Der Western Blot zur Detektion des YopE Fusionsproteins wurde mit einem anti-M45 mAk und einem HRP gekoppelten anti-IgG Zweitantikörper durchgeführt. Die Molekularmasse des Fusionsprotein YopE₁₋₁₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 beträgt 30 kDa. Als Negativkontrolle diente WA-CpYV::CM ohne Plasmid pHR429.

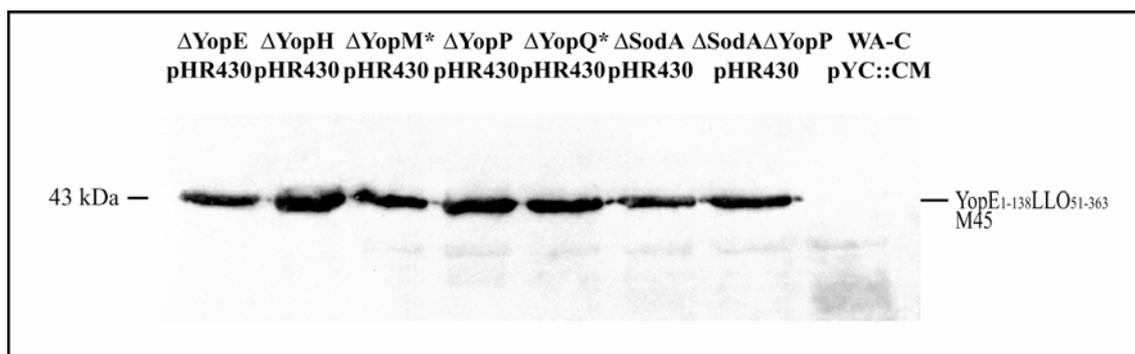


Abb. 20: Sekretion des Fusionsproteins YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 in den Kulturüberstand: Nach Transformation des Plasmides pHR430 in Δ YopE, Δ YopH, Δ YopM*, Δ YopP, Δ YopQ*, Δ SodA sowie Δ SodA Δ YopP sekretierten alle Stämme das 43 kDa große YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 Fusionsprotein. WA-CpYV::CM ohne Plasmid pHR430 diente als Negativkontrolle.

5.1.2 Nachweis der Translokation des YopE Fusionsproteins mittels Immunfluoreszenz

Die Translokation der YopE Fusionsproteine in das Zytosol von P388D1 Makrophagen wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz anhand der Δ YopP Mutante untersucht. In Zellkultur wurden P388D1 Makrophagen mit den Stämmen Δ YopPpHR429 und Δ YopPpHR430 mit einer MOI von 10 infiziert und über 5 h bei 37 °C unter Ca²⁺-Mangel (HBSS-Medium) inkubiert (s. B.8.3.1). Nach Fixierung der Makrophagen mit 3,7 % Formaldehyd/PBS wurden extrazelluläre Bakterien mit einem anti-YadA pAk und dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC

(rotes Signal) markiert. Die Detektion von translozierten Yop Fusionsproteinen erfolgte nach Permeabilisierung der Makrophagen (0,1 % Triton X-100) mit einem anti-M45 mAk und dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (grünes Signal) (s. B.7.5.1). Die Aufnahmen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop machen deutlich, dass nur YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 (pHR430) in das Zytosol von P388D1 Makrophagen transloziert wird. Auch nach Infektion mit verschiedenen MOI (1, 10 oder 100) und nach längerer Inkubationszeit (2, 5 oder 7 h) konnte keine Translokation von YopE₁₋₁₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 durch Δ YopPpHR429 beobachtet werden.

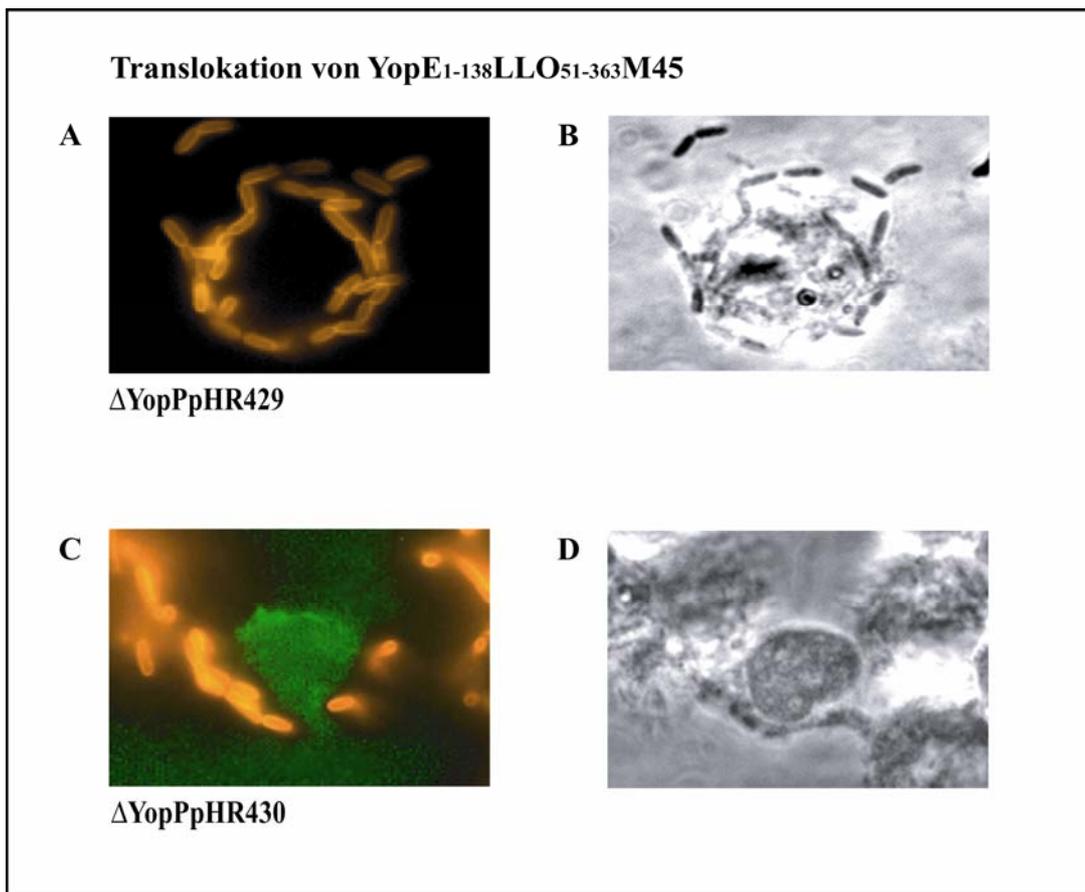


Abb. 21: Translokation des YopE Fusionsproteins in P388D1 Makrophagen: Die Translokation der Fusionsproteine YopE₁₋₁₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 und YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 in P388D1 Makrophagen wurde anhand der Δ YopP Mutante untersucht. A und C: Extrazelluläre Bakterien wurden mit einem anti-YadA mAk und einem anti-IgG Antikörper TRITC (rotes Signal) detektiert. C: Das translozierte Fusionsprotein in den Makrophagen wurde mit einem anti-M45 mAk und einem anti-IgG Antikörper FITC (grünes Signal) sichtbar gemacht. B und D: Phasenkontrast von A und C. Die Aufnahmen wurden mit einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen.

5.1.3 Nachweis der Translokation mittels Western Blot

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Immunfluoreszenzuntersuchungen (s. C.5.2) und zum Vergleich der translozierten Proteinmengen wurden P388D1 Makrophagen mit einer MOI von 10 mit den Stämmen Δ YopEpHR430, Δ YopPpHR430 und WA-CpYV::CMpHR430 infiziert (s. B.8.3.2). Der Stamm WA-CpYV::CMpHR430 wurde durch Transformation (s. B.4.7) des Plasmides pHR430 in WA-CpYV::CM generiert. Fünf Stunden nach Infektion wurden nicht adhärenente Bakterien aus der Zellkultur entfernt und extrazelluläre Yop Proteine durch Proteinase K Einwirkung degradiert. Nach Lyse der Makrophagen (0,1 % Triton X-100) wurden die Proteine des Zelllysats aus dem von Makrophagen befreiten Zellkulturüberstand gefällt (s. B.8.3.2). Zum Nachweis des Fusionsproteins YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 wurde die gesamte Menge der gefällten Proteine verwendet und im Western Blot (s. B.7.1) mit einem anti-M45 mAk und einem AP gekoppelten Zweitantikörper detektiert. Sowohl für die *yop* Deletionsmutanten Δ YopEpHR430 und Δ YopPpHR430 als auch für den Vergleichstamm WA-CpYV::CMpHR430 konnte die Translokation des Fusionsproteins YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 in das Zytosol von P388D1 Makrophagen nachgewiesen werden. Wie aus Abb. 22 ersichtlich, wurden dabei für alle drei Stämme vergleichbare Proteinmengen des translozierten Fusionsproteins ermittelt. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Immunfluoreszenzuntersuchungen (s. C.5.1.2) bestätigt dieses Ergebnis das Potential des Typ-III-Sekretionssystems von *Y. enterocolitica*, Fremdproteine in das Zytosol von APCs zu bringen.

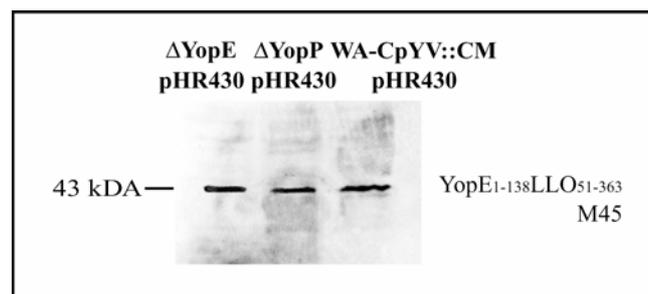


Abb. 22: Translokation von YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 mit den Stämmen Δ YopEpHR430, Δ YopPpHR430 und WA-CpYV::CMpHR430: Zelllysate von infizierten P388D1 Makrophagen wurden im Immunoblot mit einem anti-M45 und einem HRP gekoppelten Ak auf transloziertes YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 Fusionsprotein untersucht. Δ YopE, Δ YopP sowie WA-CpYV::CM translozieren vergleichbare Proteinmengen des YopE Fusionsproteins ins Zytosol von P388D1 Makrophagen.

6. Immunantwort auf YopE Fusionsproteine im Mausinfektionsmodell

6.1 Immunologische Untersuchungen in CB6F1 Mäusen

Das Protein Listeriolysin O verfügt als Modellantigen über mehrere CD4 und CD8 T-Zellepitope. Dabei ist das CD8 T-Zellepitop LLO₉₁₋₉₉ dominant in BALB/c (H-2^d) Mäusen und das CD4 T-Zellepitop LLO₁₉₀₋₂₀₁ dominant in C57BL/6 (H-2^b) Mäusen. Um sowohl die CD4 als auch die CD8 T-Zellantwort in demselben Mausstamm untersuchen zu können, wurden die immunologischen Versuche mit CB6F1 Mäusen durchgeführt. CB6F1 (H-2^{b x d}) Mäuse sind eine Kreuzung aus BALB/c und C57BL/6 Mäusen. Ihre Immunantwort gegen das LLO Protein führt zur Bildung von CD8 T-Zellen gegen Epitop LLO₉₁₋₉₉ und CD4 T-Zellen gegen Epitop LLO₁₉₀₋₂₀₁ (Geginat *et al.*, 2001).

6.1.1 Stabilität der Plasmide pHR429 und pHR430 in *Y. enterocolitica*

Ein wichtige Voraussetzung für die Untersuchungen der Immunantwort im Mausinfektionsmodell ist die stabile Expression der YopE Fusionsproteine durch die Plasmide pHR429 und pHR430 *in vivo*. Die Plasmide pHR429 und pHR430 verfügen über eine Cm^R-Kassette und ermöglichen *in vitro* eine Selektion unter Chloramphenicol. Zur Untersuchung der Stabilität der Plasmide in *Y. enterocolitica* wurden CB6F1 Mäuse oral mit 1×10^8 CFU der Stämme Δ YopEpHR429, Δ YopEpHR430, Δ YopPpHR429 und Δ YopPpHR430 infiziert (s. B.6.3.1) und die Bakterien an Tag 7 nach Infektion aus der Milz auf CIN-Agar reisoliert. Nach Transfer der Kolonien auf Cm^R-Agar wurde der Prozentsatz Cm resistenter Bakterien ermittelt. Auch sieben Tage nach Infektion wiesen von den reisolierten Bakterien 91 % das Plasmid pHR429 und 96 % das Plasmid pHR430 auf. Die Sekretion der entsprechenden Proteine in den Kulturüberstand wurde im Western Blot nachgewiesen. Eine stabile Expression der Fusionsproteine über diesen Zeitraum wurde also ermöglicht.

6.1.2 Vergleich der Virulenz von *yop* Deletionsmutanten in C57BL/6 und CB6F1 Mäusen

Es wurde untersucht, ob die Infektion mit *Y. enterocolitica* einen ähnlichen Verlauf in CB6F1 Mäusen nimmt und die Virulenzdaten aus den Versuchen mit C57BL/6 Mäusen auf die CB6F1 Maus übertragbar sind. Dazu wurden Gruppen von je sechs CB6F1 Mäusen oral mit 1×10^8 CFU der Stämme WA-CpYV::CM, $\Delta YopE$ und $\Delta YopP$ infiziert (s. B.6.3.1) und die Keimzahlen in Lumen des Dünndarms, in den Peyerschen Plaques, in der Milz und in der Leber an den Tagen fünf und sieben bestimmt (s. B.6.4). Die Infektion mit allen drei Stämmen führte zu einer systemischen Infektion mit der Besiedelung von Leber und Milz. Dabei wurden für WA-CpYV::CM an beiden Zeitpunkten die höchsten Keimzahlen ermittelt. Die Infektion mit den Stämmen $\Delta YopE$ oder $\Delta YopP$ führte zu einer Reduktion der Keimzahlen (1-2 \log_{10} Stufen) in allen Organen im Vergleich zu WA-CpYV::CM. Die Virulenzdaten in CB6F1 Mäusen wiesen für WA-CpYV::CM sowie für die *yop* Deletionsmutanten $\Delta YopE$ und $\Delta YopP$ nach oraler Infektion ähnlich hohe Keimzahlen wie in C57BL/6 Mäusen auf (Daten nicht gezeigt).

6.2 Humorale und zelluläre Immunantwort auf *YopE* Fusionsproteine *in vivo*

Die Untersuchungen der humoralen und der zellulären Immunantwort auf ein heterologes Antigen *in vivo* wurden mit den transformierten *yop* Deletionsmutanten (pHR429 und pHR430) im Vergleich zum Wildtyp *L. monocytogenes* sv1/2a EGD (s. Tab. 4) durchgeführt. Die zelluläre Immunantwort mit der Bildung von spezifischen T-Zellen gegen das heterologe Antigen wurde 6-8 Wochen nach oraler Infektion im ELISPOT-Test (s. B.7.4) untersucht. Dabei wurde die Menge der LLO₁₉₀₋₂₀₁ spezifischen CD4 und der LLO₉₁₋₉₉ spezifischen CD8 T-Zellen als Summe der gebildeten IFN- γ Spots nach Induktion von 1×10^5 Splenozyten mit dem korrespondierenden Peptid bestimmt. Die Versuche wurden mit $\Delta YopE$, $\Delta YopH$, $\Delta YopM^*$, $\Delta YopP$ und $\Delta YopQ^*$ Mutanten sowohl für das sekretierte (pHR429) als auch für das translozierte (pHR430) Fusionsprotein durchgeführt.

6.2.1 CD4 und CD8 T-Zellantwort auf das sekretierte Fusionsprotein YopE₁₋₁₈LLO₅₁₋₃₆₃M45

Es wurden Gruppen von zehn CB6F1 Mäusen oral mit 1×10^8 CFU der Mutanten Δ YopEpHR429, Δ YopHpHR429, Δ YopM*pHR429, Δ YopPpHR429 und Δ YopQ*pHR429 infiziert (s. B.6.3.1). Als Positivkontrolle wurde mit einer subletalen Dosis von 5×10^3 CFU *L. monocytogenes* sv1/2a EGD i.p. immunisiert (s. B.6.3.3). 6-8 Wochen nach Infektion wurde die Milz entnommen und die T-Zellantwort nach Inkubation von 1×10^5 Splenozyten mit den Peptiden LLO₉₁₋₉₉ oder LLO₁₉₀₋₂₀₁ (10^{-4} M) mittels ELISPOT-Test bestimmt. Wie in Abb. 23 ersichtlich führt die Immunisierung von Mäusen mit einer subletalen Dosis *L. monocytogenes* zu einer charakteristischen CD4 und CD8 T-Zellantwort auf das LLO Peptid. Auch Sekretion des Fusionsproteins YopE₁₋₁₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 durch Δ YopP induziert eine LLO₁₉₀₋₂₀₁ spezifische CD4 T-Zellantwort. Mit den Mutanten Δ YopEpHR429, Δ YopHpHR429, Δ YopM*pHR429 und Δ YopQ*pHR429 wurde keine LLO₁₉₀₋₂₀₁ spezifische CD4 T-Zellantwort gemessen. LLO₉₁₋₉₉ spezifische CD8 T-Zellen konnten für keine der *yop* Deletionsmutanten nachgewiesen werden.

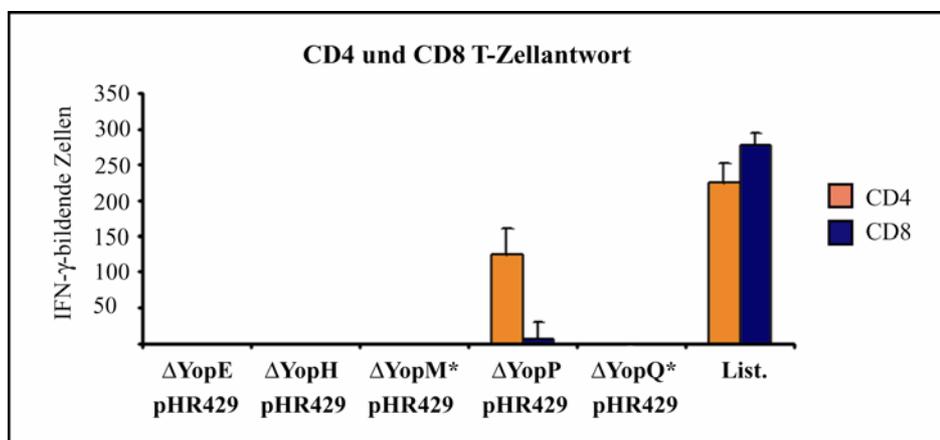


Abb 23: CD4 und CD8 T-Zellantwort auf sekretiertes YopE Fusionsprotein: Anzahl der CD4 und CD8 spezifischen T-Zellen in 1×10^5 Splenozyten nach oraler Infektion mit 1×10^8 CFU der Stämme Δ YopEpHR429, Δ YopHpHR429, Δ YopM*pHR429, Δ YopPpHR429 und Δ YopQ*pHR429 im Vergleich mit *L. monocytogenes* sv1/2a EGD. Dargestellt ist die im ELISPOT-Test (s. B.7.4) ermittelte Anzahl IFN- γ -bildender Zellen/ 10^5 Splenozyten (Detektionsgrenze < 5 IFN- γ bildende Zellen/ 10^5 Splenozyten).

6.2.2 CD4 und CD8 T-Zellantwort auf das translozierte Fusionsprotein YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45

Die Bestimmung der CD4 und CD8 T-Zellantwort auf das translozierte Fusionsprotein YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 erfolgte nach oraler Infektion mit den Stämmen Δ YopEpHR430, Δ YopHpHR430, Δ YopMpHR430, Δ YopPpHR430 und Δ YopQpHR430 wie unter C.7.1 beschrieben. Translokation des Fusionsproteins durch Δ YopP führte nach Induktion der Splenozyten mit den Peptiden LLO₉₁₋₉₉ und LLO₁₉₀₋₂₀₁ zur Stimulation IFN- γ -bildender T-Zellen (s. Abb. 24). Dabei wurden ähnlich hohe Zahlen CD4 und CD8 spezifische T-Zellen nach Infektion mit Δ YopPpHR430 und für die Immunisierung mit *L. monocytogenes* ermittelt. Die Infektion mit den Stämmen Δ YopEpHR430, Δ YopHpHR430 oder Δ YopM*pHR430 hingegen führt nur zu einer schwachen CD4 T-Zellantwort. Die CD8 spezifische T-Zellantwort mit diesen Stämmen lag unterhalb der Detektionsgrenze des ELISPOT-Tests (< 5 IFN- γ bildende Zellen/ 10^5 Splenozyten). Der Stamm Δ YopQ*pHR430 zeigte eine CD4 T-Zellantwort und verfügt darüber hinaus über eine schwache aber messbare CD8 T-Zellantwort.

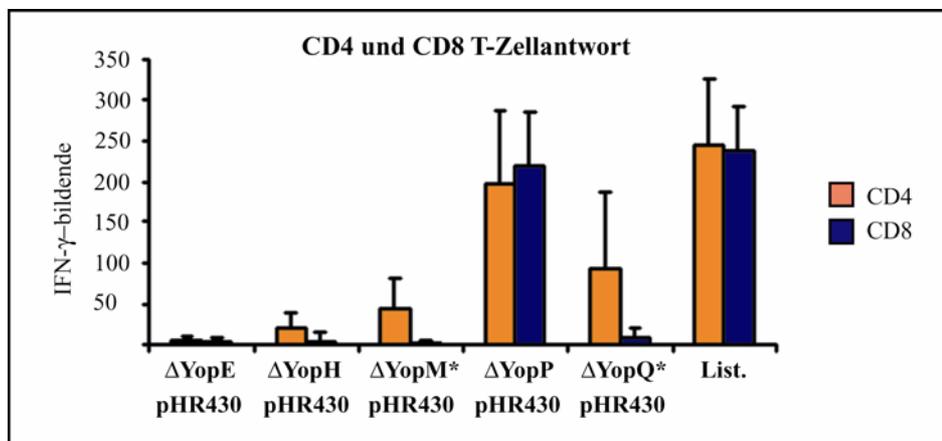


Abb. 24: CD4 und CD8 T-Zellantwort auf transloziertes YopE Fusionsprotein: Anzahl der CD4 und CD8 spezifischen T-Zellen in 1×10^5 Splenozyten nach oraler Infektion mit 1×10^8 CFU der Stämme Δ YopEpHR430, Δ YopHpHR430, Δ YopM*pHR430, Δ YopPpHR430, Δ YopQ*pHR430 und *L. monocytogenes* sv1/2a EGD.

6.2.3 CD4 und CD8 T-Zellantwort mit Δ SodApHR430 und Δ SodA Δ YopPpHR430 im Vergleich

Die reduzierte T-Zellantwort nach Infektion mit YopP exprimierenden Stämmen war möglicherweise durch die unterschiedliche Kolonisierung in der Maus bedingt (s. C.2.1). Um einen Einfluss von YopP auf die Immunantwort zu bestätigen, wurde die CD4 und CD8 T-Zellantwort auf das LLO Antigen mit der Δ SodA Mutante im Vergleich zu einer Δ SodA Δ YopP Doppelmutante untersucht. Die Infektion mit beiden Stämmen blieb auf den Dünndarm und die Peyerschen Plaques begrenzt (orale Infektion mit 1×10^8 CFU Tag 7: Δ SodA: Dünndarm $4,21 \pm 0,43$ und PP $3,79 \pm 0,51$ \log_{10} CFU; Δ SodA Δ YopP: Dünndarm $3,91 \pm 0,36$ und PP $3,54 \pm 0,39$ \log_{10} CFU (s. B.6.3.1)). Die Δ SodA Mutante als bakterieller Hintergrund für das intakte und das *yopP* deletierte pYV-Plasmid ermöglichte somit die Untersuchung der T-Zellantwort mit zwei ähnlich virulenten Stämmen.

Nach Transformation mit dem Plasmid pHR430 wurde die LLO₁₉₀₋₂₀₁ und LLO₉₁₋₉₉ spezifische CD4 und CD8 T-Zellantwort der beiden Stämme im ELISPOT-Test (s. B.7.4) miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass nur die Doppelmutante Δ SodA Δ YopP eine CD4 und CD8 T-Zellantwort auslöst, wohingegen die Anzahl der LLO₁₉₀₋₂₀₁ und LLO₉₁₋₉₉ spezifischen IFN- γ -bildenden T-Zellen nach Infektion mit der Δ SodA Mutante unterhalb des Detektionslimits blieb (s. Abb. 25). Die Ergebnisse zeigen einen Einfluss des Effektorproteins YopP auf die Hemmung der T-Zellantwort *in vivo*. Dabei ist der Effekt von YopP nicht allein auf eine unterschiedliche Kolonisierung in der Maus zurückzuführen. Im Vergleich zu Δ YopP führte die Δ SodA Δ YopP Doppelmutante jedoch zu einer geringeren Anzahl IFN- γ -bildender T-Zellen.

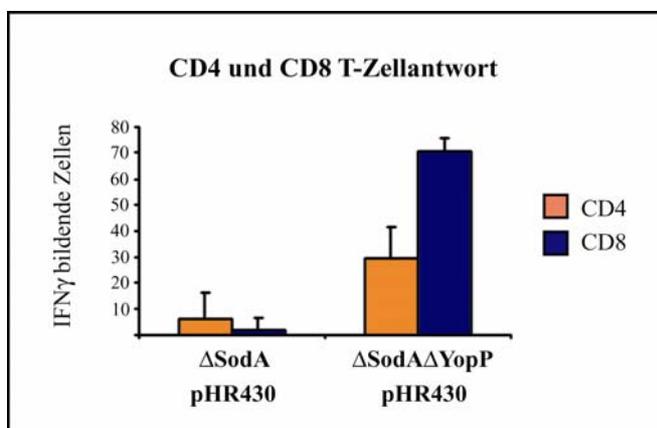


Abb. 25: CD4 und CD8 T-Zellantwort auf YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 mit Δ SodApHR430 und Δ SodA Δ YopPpHR430 im Vergleich: Die Infektion mit 1×10^8 CFU führte nur mit der Δ SodA Δ YopPpHR430 Mutante zur Bildung Peptid spezifischer CD4 und CD8 T-Zellen. Δ SodApHR430 erzeugte keine signifikante LLO₉₁₋₉₉ und LLO₁₉₀₋₂₀₁ spezifische T-Zellantwort.

6.3 Humorale Immunantwort auf rekombinantes Listeriolysin O

Zur Untersuchung der Antikörperantwort auf das heterologe Antigen YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 wurden Gruppen von 15 CB6F1 Mäusen mit den Stämmen Δ YopEpHR430, Δ YopHpHR430, Δ YopM*pHR430, Δ YopPpHR430, Δ YopQ*pHR430 und den Stämmen Δ SodApHR430 und Δ SodA Δ YopPpHR430 in einer Konzentration von 1×10^8 CFU oral infiziert (s. B.6.3.1). Als Vergleich wurde eine Gruppe von Mäusen mit *L. monocytogenes* sv1/2a EGD in der Konzentration von 5×10^3 CFU i.p. infiziert (s. B.6.3.3). Die Seren wurden am Tag 21 nach Infektion entnommen (s. B.6.5) und die IgG Antikörperantwort auf rekombinantes LLO (100 μ g/ml) im ELISA untersucht (s.B.7.3). Die Intensität der Antikörperantwort war bei den verschiedenen *yop* Deletionsmutanten sehr unterschiedlich (s. Abb. 26).

Die Positivkontrolle, *L. monocytogenes* sv1/2a EGD i.p. infiziert, zeigte eine deutliche Immunantwort auf rekombinantes LLO (\log_{10} Titer $2,3 \pm 0,82$). Eine etwas schwächere Antikörperantwort wurde für die Mutanten Δ YopHpHR430 (\log_{10} Titer $1,4 \pm 0,91$), Δ YopM*pHR430 (\log_{10} Titer $1,25 \pm 0,97$), Δ YopQ*pHR430 (\log_{10} Titer $1,5 \pm 1,02$) und Δ SodA Δ YopPpHR430 (\log_{10} Titer $1,72 \pm 1,05$) gemessen. Die Infektion mit den Stämmen Δ YopEpHR430 und Δ SodApHR430 führte hingegen zu einer sehr schwachen Antikörperantwort (Δ YopEpHR430 \log_{10} Titer $0,61 \pm 0,63$; Δ SodApHR430 \log_{10} Titer $0,79 \pm 0,58$). Die höchsten LLO spezifischen IgG-Titer im Serum der Mäuse wurden nach Infektion mit Δ YopPpHR430 gemessen (\log_{10} Titer $2,82 \pm 0,95$). Die Ergebnisse der IgG Antikörperantwort auf das rekombinante LLO Protein korrelieren demnach mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen der CD4 T-Zellantwort. Die Stämme mit einer guten CD4 T-Zellantwort im ELISPOT lösten auch eine gute humorale Immunantwort auf das rekombinante LLO Protein aus.

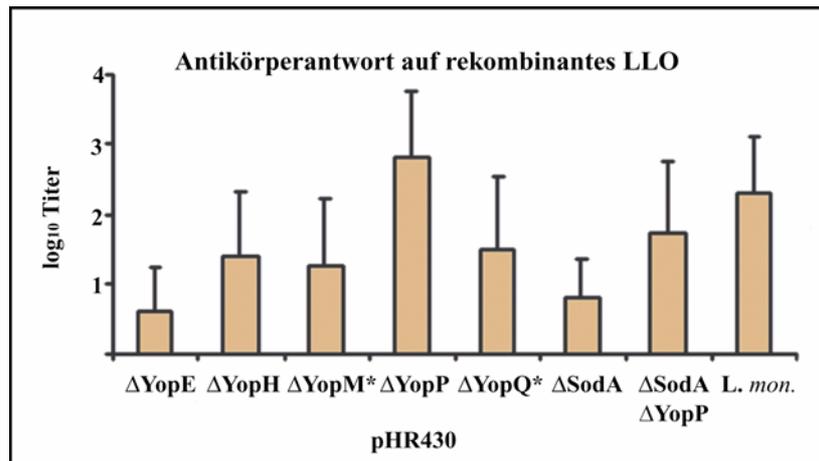


Abb. 26: IgG Antikörperantwort auf rekombinantes LLO: Die Untersuchung der Antikörperantwort auf rekombinantes LLO wurde 21 Tage nach Infektion mit den Stämmen Δ YopEpHR430, Δ YopHpHR430, Δ YopM*pHR430, Δ YopPpHR430, Δ YopQ*pHR430, Δ SodApHR430 und Δ SodA Δ YopPpHR430 im Vergleich zu *L.monocytogenes* sv1/2a EGD durchgeführt. Die Antikörperantwort ist dargestellt als log₁₀ Titer der höchsten Verdünnung, die einen Unterschied von 0.1 der OD₄₀₅ im Vergleich zu einem negativen Kontrollserum (nicht infizierte Maus) ergab.

7. In vitro Antigenpräsentation von LLO₉₁₋₉₉ in dendritischen Zellen

Die Ergebnisse des ELISPOT-Tests (s. C.5.3.2) zeigten für Δ YopPpHR430 die Induktion einer signifikanten CD4 und CD8 T-Zellantwort gegen das translozierte Antigen. Um eine mögliche Hemmung der T-Zell Aktivierung durch das Effektorprotein YopP auch *in vitro* nachzuweisen, wurde die Antigenpräsentation für das CD8 T-Zell Epitop LLO₉₁₋₉₉ in APCs untersucht.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe G. Geginat (Universität Heidelberg) wurde ein *in vitro* Antigenpräsentationsassay (s. B.8.4) durchgeführt, bei dem aus dem Knochenmark von Balb/c Mäusen gewonnene dendritische Zellen als APCs genutzt und mit den Stämmen Δ YopP, Δ YopPpHR430, WA-CpYV::CM und WA-CpYV::CMpHR430 infiziert wurden. Nach mehrmaligem Waschen wurden mit DCs assoziierte Bakterien mit 100 μ g/ml Gentamicin abgetötet. LLO₉₁₋₉₉ spezifische CD8 T-Zellen wurden aus *L. monocytogenes* infizierten Balb/c Mäusen gewonnen und mit den infizierten DCs über Nacht (12-18 h) inkubiert. Die Fähigkeit dendritischer Zellen, das Epitop LLO₉₁₋₉₉ den für dieses Peptid spezifischen CD8 T-Zellen zu präsentieren, wurde im ELISA durch Messen des in den Zellkulturüberstand sekretierten IFN- γ bestimmt. Die Messung wurde an verschiedenen

Zeitpunkten (1 h, 2 h und 4 h nach Infektion) und mit unterschiedlichen MOI (MOI von 1, 10 und 100) durchgeführt.

An allen drei Zeitpunkten führte die Infektion der APC mit dem Stamm Δ YopPpHR430 zu einer wesentlich stärkeren Stimulation der LLO spezifischen T-Lymphozyten als mit dem Vergleichstamm WA-CpYV::CMpHR430 (s. Abb. 27). Dabei wurden die höchsten IFN- γ Werte bzw. stärkste Stimulation für beide Stämme nach 1 h mit einer MOI von 10 gemessen. Eine MOI von 100 (toxische Effekte der Yop Proteine) ebenso wie eine MOI von 1 (unvollständige Translokation) führten zu einer schwächeren Antigenpräsentation und wesentlich geringeren IFN- γ Werten. Die Infektion mit Δ YopP oder WA-CpYV::CM führte erwartungsgemäß nicht zu einer LLO₉₁₋₉₉ spezifischen T-Zellantwort.

Die signifikant stärkere Sekretion von IFN- γ nach Infektion mit Δ YopPpHR430 verdeutlicht den Einfluss von YopP auf die Antigenpräsentation *in vitro* und korreliert mit den *in vivo* Ergebnissen der ELISPOT Versuche.

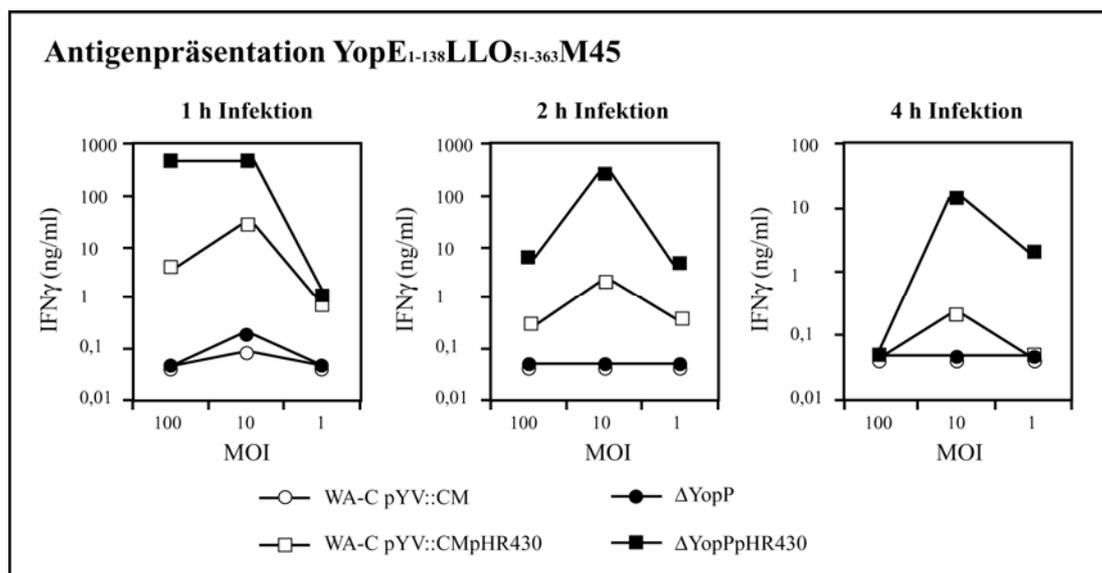


Abb. 27: Einfluss von YopP auf die Antigenpräsentation in dendritischen Zellen: DCs wurden mit den Stämmen Δ YopP, Δ YopPpHR430, WA-CpYV::CM und WA-CpYV::CMpHR430 mit einer MOI von 1, 10 und 100 über 1, 2 oder 4 h infiziert. Die Präsentation des MHC Klasse-I spezifischen Epitops LLO₉₁₋₉₉ wurde *in vitro* im Antigenpräsentationsassay mit Epitop spezifischen CD8 T-Zellen untersucht. Als Maß für die Aktivierung der T-Zellen wurde die in den Zellkulturüberstand sekretierte Menge an IFN- γ gemessen.

8. Bestimmung der Apoptose mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Da der Effektor YopP bekanntlich an der Induktion von Apoptose in Makrophagen beteiligt ist (Ruckdeschel *et al.*, 1997), wurde vermutet, dass die Hemmung der Antigenpräsentation auf Induktion von Apoptose in DCs zurückzuführen war. Der Einfluss von YopP auf die Apoptose von DCs wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Fünf Tage alte DCs wurden mit einer MOI von 10 mit den Stämmen Δ YopP und WA-CpYV::CM infiziert (s. B.7.5). Die Bakterien wurden 2 h nach Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von 100 μ g/ml Gentamicin abgetötet. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde 3 h und 5 h nach Infektion durch Färbung mit Annexin V Fluorescein-Konjugat und Propidium Jodid im Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt. Als Negativkontrolle wurde der Versuch mit nicht infizierten DCs durchgeführt. WA-CpYV::CM induzierte schon nach kurzer Zeit Apoptose von dendritischen Zellen. So sind 3 h nach Infektion 48 % \pm 2 % und 5 h nach Infektion 90 % \pm 5 % der mit WA-CpYV::CM infizierten Zellen apoptotisch (s. Abb. 28). Im Gegensatz dazu wiesen mit der Δ YopP Mutante infizierte Zellen eine deutlich geringere Anzahl apoptotischer Zellen auf (3 h = 12,5 % \pm 2,5 %; 5 h = 14 % \pm 3 %). Der Prozentsatz apoptotischer Zellen ohne Infektion lag bei 8 % \pm 2 % nach 3 h und 9 % \pm 3 % nach 5 h. Die Deletion von *yopP* führte zu einer deutlichen Reduktion von apoptotischen Zellen im Vergleich zu WA-CpYV::CM.

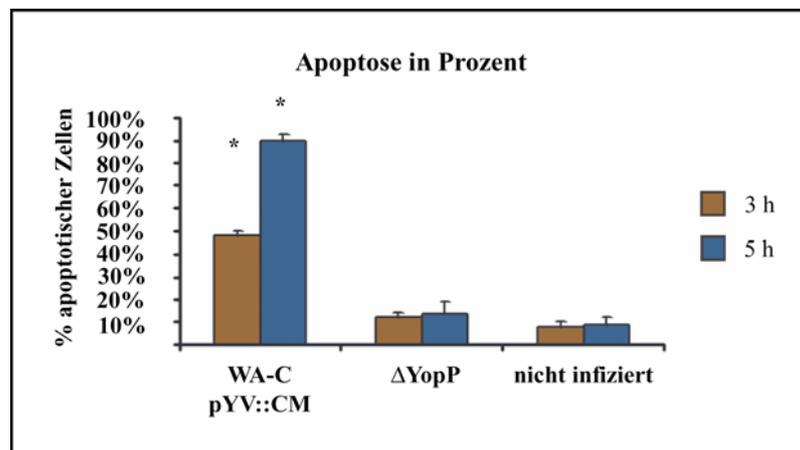


Abb. 28: YopP induziert Apoptose von dendritischen Zellen: Nach Infektion von DCs mit Δ YopP und WA-CpYV::CM für 2 h mit einer MOI von 10 wurden extrazelluläre Bakterien durch Zugabe von 100 μ g/ml Gentamicin abgetötet. DCs wurden 3 h und 5 h nach Infektion mit einem Annexin V Fluorescein-Konjugat und Propidium Jodid angefärbt und die Anzahl apoptotischer Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop durch Auszählen von jeweils 100 Zellen bestimmt. Sternchen markieren eine statistisch signifikante Erhöhung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen.

9. Untersuchung des Schutzes gegen eine *L. monocytogenes* Infektion

Orale Immunisierung mit YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 und Schutzversuch

Die Fähigkeit des Fusionsproteins YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45, Schutz gegen eine Infektion mit *L. monocytogenes* zu erzeugen, wurde mit den Stämmen Δ SodA (besitzt alle Yop Effektorproteine), Δ YopE (ähnliche Kolonisierung wie Δ YopP) und Δ YopP untersucht (s. B.6.6). Acht Wochen nach oraler Infektion (s. B.6.3.1) mit 1×10^8 CFU der Impfstämme Δ YopE_{pHR430}, Δ YopP_{pHR430}, Δ SodA_{pHR430} bzw. den Negativkontrollen Δ YopE und Δ YopP wurden die Mäuse mit 5×10^4 CFU *L. monocytogenes* sv1/2a EGD i.v. belastet. 3 Tage nach Infektion wurde die Milz entnommen und die CFU der reisolierten Bakterien auf PALCAM Listerien Agar bestimmt. Als Positivkontrolle wurde mit einer Dosis (4×10^3 CFU) von *L. monocytogenes* sv1/2a EGD i.p. immunisiert (s. B.6.3.3). Die i.p. Immunisierung mit *L. monocytogenes* sv1/2a EGD vermittelte einen nahezu vollständigen Schutz der Mäuse gegen eine *Listeria* Infektion. Nach Infektion mit den Impfstämmen Δ YopE_{pHR430} und Δ SodA_{pHR430}, beide translozieren das Fusionsprotein YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45, sowie mit den Stämmen Δ YopE und Δ YopP wurden sehr hohe Keimzahlen aus der Milz reisoliert (10^5 - 10^6 CFU/Milz). Nach einmaliger oraler Immunisierung mit dem Impfstamm Δ YopP_{pHR430} konnte eine signifikante Reduktion der Keimzahlen um 2-3 log₁₀ Stufen in der Milz (10^3 CFU/Milz) festgestellt werden (s. Abb. 29). Die Immunisierung mit dem Impfstamm Δ YopP_{pHR430} führte zu einem partiellen Schutz gegen eine *Listeria* Infektion.

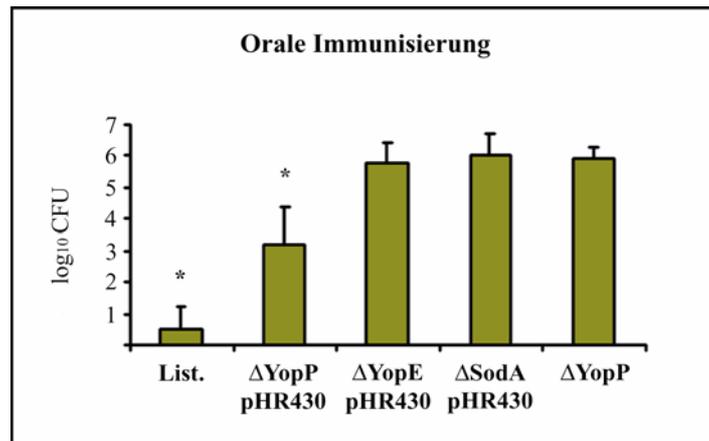


Abb. 29: Immunisierung mit YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45: Untersuchung des protektiven Potentials von YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 gegen eine *Listeria* Wildtyp Infektion mit den Stämmen ΔYopEpHR430, ΔYopPpHR430 und ΔSodApHR430. Sternchen kennzeichnen eine statistisch signifikante Reduktion der Keimzahlen in der Milz. Die Immunisierung mit 4×10^3 CFU *L. monocytogenes* sv1/2a EGD i.p. vermittelte nahezu vollständigen Schutz gegen eine *Listeria* Wildtyp Infektion. Orale Immunisierung mit 1×10^8 CFU des Stammes ΔYopPpHR430 führte zu einer signifikanten Reduktion der Keimzahlen in der Milz (10^3 CFU für ΔYopPpHR430 versus 10^{5-6} CFU für ΔYopEpHR430 und ΔSodApHR430).

D. Diskussion

Der Einsatz von Bakterien als orale Lebendimpfstoffe ist einer der vielversprechenden Ansätze bei der Entwicklung neuer Impfstoffe. Für viele verschiedene Erreger konnte gezeigt werden, dass sie sich als Vektoren für die Präsentation fremder Antigene eignen und eine gute Immunantwort hervorrufen (Medina und Guzmán, 2001). Ein weit verbreiteter Mechanismus für die Präsentation von Antigenen sind dabei die Typ-III-Sekretionssysteme von *Salmonella* und *Yersinia*. So konnten mit diversen attenuierten *Salmonella typhimurium* Mutanten erfolgreich Impfungen gegen bakterielle und virale Erreger durchgeführt werden. Auch *Yersinia* scheint auf Grund der extrazellulären Lebensweise im Wirtsorganismus, der Besiedelung lymphatischer Organe und einer guten humoralen und zellulären Immunantwort für die Entwicklung neuer Impfstoffe geeignet zu sein. Eine Reihe von Untersuchungen konnte zeigen, dass Yop Effektorproteine und V-Antigen an der Modulation von eukaryontischen Zellstrukturen beteiligt sind und dadurch Einfluss auf die Immunantwort im Wirtsorganismus nehmen (Cornelis *et al.*, 2002). Die Inaktivierung der entsprechenden *yop* Gene sollte daher zu einer Abschwächung der Virulenz führen und eine Modifikation von immunmodulatorischen Effekten durch *Yersinia* hervorrufen. Dies bietet einen möglichen Ansatz für die Entwicklung eines oralen Lebendimpfstoffes auf Basis von *Y. enterocolitica*.

1. Einfluss der Yop Effektorproteine auf Virulenz und Immunantwort im Mausinfektionsmodell

1.1 Konstruktion genetisch stabiler *yop* Deletionsmutanten

Zur Untersuchung der Virulenzeigenschaften und der immunmodulatorischen Aktivität der Yop Proteine wurden sieben verschiedene Yop Deletionsmutanten von *Y. enterocolitica* O:8 (Biovar 1B) hergestellt (s. C. Ergebnisse 1.2). Neben den Genen der sechs Effektorproteine YopE, YopH, YopM, YopO, YopP und YopT wurde auch das Gen für YopQ, das an der Translokation der Yop Effektorproteine beteiligt ist, mit Hilfe der ET-Klonierung deletiert. Die neue Methode der ET-Klonierung, ursprünglich für *E. coli* entwickelt, ermöglichte es erstmals, die Mutagenese direkt in *Yersinia* durchzuführen. Dabei wurde durch homologe Rekombination eines PCR-Fragmentes mit dem entsprechenden Genabschnitt auf dem pYV-Plasmid das jeweilige *yop* durch eine Kan^R-Kassette ersetzt. Ein Einfluss auf die Transkription nachfolgender Gene (polare Effekte) wurde vermieden durch Insertion einer

Kan^R-Kassette ohne Terminatorstruktur. Unerwünschte Rekombinationen oder mögliche Defekte im Chromosom konnten ausgeschlossen werden, da die pYV-Plasmide nach erfolgter Mutagenese in einen plasmidlosen WA-C Stamm transformiert wurden. Darüber hinaus wurde durch Restriktionsverdau und anschließender Kontrolle der Bandenmuster im Agarosegel sichergestellt, dass auch innerhalb der pYV-Plasmide keine zusätzlichen Rekombinationen aufgetreten waren (s. C.1.4).

Yops werden in BHI-Medium bei 37 °C unter Ca²⁺-Mangel in den Überstand der Bakterienkultur sekretiert und ermöglichten so die Kontrolle der Mutation sowie der korrekten Expression aller anderen, nicht mutierten Yops im Coomassie gefärbten SDS-Gel (Heesemann *et al.*, 1984). Für alle Mutanten konnte gezeigt werden, dass mit Ausnahme des deletierten Proteins sämtliche Yops in unveränderter Menge sekretiert werden (s. C.1.4). Des Weiteren wurde die exakte Mutation der entsprechenden *yop* Gene mittels PCR und Western Blot bestätigt. Die Komplementierung der am stärksten attenuierten Mutante Δ YopH mit dem Plasmid pYopHSycH führte zur Sekretion von YopH in den Bakterienüberstand. Δ YopH pYopHSycH verfügte im Mausinfektionsmodell über eine vergleichbare Virulenz wie WA-CpYV::CM (s. C.2.4).

1.2 Virulenzstudien im oralen und i.v. Mausinfektionsmodell

Yop Effektorproteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Besiedelung und dem Überleben von *Yersinia* im Wirtsorganismus. Verschiedene Untersuchungen wurden bereits gemacht, um herauszufinden, welchen Einfluss Yops auf die Virulenz im Mausinfektionsmodell besitzen. Dabei wurden die Studien meist mit *Y. pseudotuberculosis* oder *Y. enterocolitica* O:9 Mutanten durchgeführt, die sich in einigen Virulenzfaktoren und dem klinischen Bild deutlich von *Y. enterocolitica* O:8 unterscheiden. *Y. enterocolitica* verfügt über das zusätzliche Effektorprotein YopT (Iriarte und Cornelis, 1998) und zeigt signifikante Unterschiede in einer Reihe weiterer Virulenzfaktoren. So ist die Invasin vermittelte Aufnahme in Zellkultur bei *Y. pseudotuberculosis* wesentlich effizienter als bei *Y. enterocolitica* (Dersch und Isberg, 2000). YadA, ein essentieller Pathogenitätsfaktor von *Y. enterocolitica*, ist erforderlich für das Überleben und die Proliferation in Peyerschen Plaques, scheint aber für die Virulenz von *Y. pseudotuberculosis* von untergeordneter Bedeutung zu sein (Pepe *et al.*, 1995; Tamm *et al.*, 1993). Darüber hinaus wurden Unterschiede in der Serumresistenz (Une und Brubaker, 1984) und der Resistenz gegenüber antibakteriellen kationischen Peptiden festgestellt (Bengoechea *et al.*, 1998). Daher sind die

Ergebnisse aus Virulenzstudien mit *Y. pseudotuberculosis* nicht einfach auf *Y. enterocolitica* übertragbar.

Untersuchungen mit den weniger virulenten Stämmen von *Y. enterocolitica* der Serogruppen O:3 und O:9 (HPI-negativ) erfordern die Vorbehandlung der Mäuse mit dem Eisenchelator Desferrioxamin B (Autenrieth *et al.*, 1995). Die Versorgung mit Eisen erzeugt zwar eine ausreichende Mausvirulenz der Stämme, führt aber ebenso zu einer Immunsuppression im Wirtsorganismus und erschwert dadurch die Interpretation der Ergebnisse (Autenrieth *et al.*, 1995). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass YopP von *Y. enterocolitica* O:8 die NF- κ B Signaltransduktion wesentlich effizienter inhibiert und Apoptose vermittelt als der Serotyp O:9 (Ruckdeschel *et al.*, 2001).

Um eine Vergleichbarkeit der Virulenzdaten zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit für alle *yop* Deletionsmutanten derselbe Mausstamm verwendet und mit der gleichen Dosis über denselben Applikationsweg infiziert.

Für *Y. enterocolitica* O:9 waren die Untersuchungen mit *yop* Deletionsmutanten bislang auf die Effektoren YopM und YopQ beschränkt, die nach i.v. Infektion eine deutliche Abschwächung der Virulenz in mit Desferrioxamin B vorbehandelten Mäusen zeigten. Beide Stämme führten zwar zu einer Besiedelung von Leber und Milz in Swiss Mäusen, wiesen dabei aber wesentlich geringere Keimzahlen verglichen mit dem Wildstamm auf (Mulder *et al.*, 1989). Die Virulenzdaten für Δ YopM* und Δ YopQ* in *Y. enterocolitica* O:8 konnten diese Ergebnisse bestätigen und zeigten auch nach oraler Infektion eine starke Attenuierung beider Stämme (s. C.2.1). Dabei beschränkte sich die Besiedelung bei oral infizierten Mäusen auf den Dünndarm und die Peyerschen Plaques und führte nicht zu einer systemischen Infektion mit Befall von Leber und Milz. Trotz einer deutlichen Reduktion der Keimzahlen verglichen mit dem Kontrollstamm WA-CpYV::CM konnten auch 3 Wochen nach Infektion noch Bakterien beider Stämme aus dem Dünndarm reisoliert werden (s. Abb. 9). Die Ergebnisse nach oraler Infektion für Δ YopQ* entsprechen Studien einer *yopK* Mutante in *Y. pseudotuberculosis* (Holmström *et al.*, 1995). Verlust von YopQ, das Einfluss auf die Translokation und/oder auf die durch YopB induzierte Porenbildung besitzen soll (Holmström *et al.*, 1997), verhindert möglicherweise die effektive Immunsuppression im Wirtsorganismus und dadurch die Ausbreitung einer systemischen Infektion. Die Virulenzdaten belegen, dass sowohl YopM als auch YopQ essentielle Effektorproteine darstellen und für die Etablierung einer systemischen Yersiniose in Mäusen erforderlich sind (s. C.2.1).

Virulenzuntersuchungen mit $\Delta YopE$, $\Delta YopH$, $\Delta YopO$ und $\Delta YopP$ Mutanten wurden bislang nur mit *Y. pseudotuberculosis* durchgeführt und wiesen teilweise deutliche Unterschiede zum Virulenzverhalten der entsprechenden *yop* Mutanten in *Y. enterocolitica* auf.

So war $\Delta YopE$ in *Y. enterocolitica* nach oraler Infektion nur leicht attenuiert und führte zu einer systemischen Infektion mit Kolonisierung von Leber und Milz (s. C.2.1). Des Weiteren konnte $\Delta YopE$ auch 12 Tage nach Infektion noch im Dünndarm und den Peyerschen Plaques nachgewiesen werden (s. Abb. 8). Eine entsprechende $\Delta YopE$ Mutante in *Y. pseudotuberculosis* hingegen war auf Grund einer starken Attenuierung nicht in der Lage, die Milz zu besiedeln und konnte auch in den Peyerschen Plaques nicht länger als 4 Tage persistieren (Logsdon *et al.*, 2003).

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Virulenzdaten für $\Delta YopE$ in *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* bietet YopT, das nur in *Y. enterocolitica* vorhanden ist. Da sowohl YopE und YopO als auch YopT mit Rho GTPasen interagieren und an der Hemmung der Phagozytose beteiligt sind, könnte der Verlust des einen Effektors durch die anderen kompensiert werden.

$\Delta YopH$ zeigte den höchsten Grad an Attenuierung aller Stämme sowohl im oralen als auch im i.v. Infektionsmodell (s. C.2.1 und C.2.2). Nach oraler Infektion wurden Dünndarm und Peyersche Plaques mit geringeren Keimzahlen besiedelt als durch alle anderen getesteten *yop* Deletionsmutanten. Obwohl $\Delta YopH$ an Tag 12 auch früher als die anderen *yop* Deletionsmutanten wieder aus den Peyerschen Plaques eliminiert wurde, konnten auch 3 Wochen nach Infektion noch Bakterien aus dem Dünndarm reisoliert werden (s. Abb. 9). Eine systemische Infektion blieb indes aus. Der i.v. Infektionsversuch führte zu einer raschen Abnahme der Keimzahlen zwischen Tag 2 und Tag 4 in Leber und Milz und unterstreicht die große Bedeutung von YopH als Virulenzfaktor (s. C.2.2). Auch für $\Delta YopH$ in *Y. pseudotuberculosis* wurde eine verringerte Virulenz festgestellt (Logsdon *et al.*, 2003).

Die Mausvirulenz von $\Delta YopO$ in *Y. pseudotuberculosis* wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite zeigte eine *Y. pseudotuberculosis* $\Delta YopO$ Mutante ein ähnliches Virulenzverhalten wie der Wildtyp (Logsdon und Mecsas, 2003), auf der anderen Seite konnte mit $\Delta YopO$ kein systemischer Verlauf nach oraler Infektion festgestellt werden. Dabei handelte es sich allerdings um einen Stamm, der neben einer Mutation in *yopO* auch einen Defekt in *yadA* aufwies und möglicherweise aus diesem Grund nicht zur Kolonisierung der Milz führte (Galyov *et al.*, 1994). Für $\Delta YopO$ in *Y. enterocolitica* konnten sowohl im

oralen als auch im i.v. Versuch keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der Mausvirulenz im Vergleich mit WA-CpYV::CM festgestellt werden (s. C.2). So zeigte die orale Infektion mit Δ YopO einen progredienten Verlauf und führte zwischen Tag 7 und Tag 12 zum Tod der Mäuse (s. Abb. 7 und Abb. 8).

YopT ist ein zusätzliches Effektorprotein von *Y. enterocolitica*, dessen Einfluss auf die Mausvirulenz mit *Y. enterocolitica* O:9 bislang nur unzureichend untersucht wurde (Iriarte und Cornelis, 1998). Dabei zeigte sich, dass die Kolonisierung der Peyerschen Plaques 2 Tage nach Infektion durch Deletion von *yopT* nicht beeinträchtigt wurde. Obwohl für YopT wie auch für YopO eine starke Hemmung der Phagozytose in Zellkultur nachgewiesen werden konnte (Grosdent *et al.*, 2002), ist die Δ YopT Mutante in ihrer Virulenz nicht abgeschwächt, sondern weist sogar höhere Keimzahlen in Leber und Milz im Vergleich zu WA-CpYV::CM auf (s. C.4). Da YopE, YopO wie auch YopT in unterschiedlicher Weise mit den GTPasen Rho und Rac interagieren (s. A.2.2.1) und so die Phagozytose hemmen, wird möglicherweise die Funktion des fehlenden Yops durch die jeweils anderen ersetzt. Denkbar ist auch, dass der Einfluss von YopO und YopT auf die Phagozytose erst sichtbar wird, wenn es nach mehreren Wochen zu einer effektiven Immunantwort im Wirtsorganismus kommt. Da die Infektion mit Δ YopO und Δ YopT innerhalb kürzester Zeit letal verläuft, erscheint das Infektionsmodell mit C57Bl/6 Mäusen hinsichtlich dieser Fragestellung ungeeignet.

In *Y. enterocolitica* wies die Δ YopP Mutante nur eine leichte Abschwächung der Mausvirulenz im Vergleich zu WA-CpYV::CM auf (s. C.2.). Oral appliziert führte Δ YopP zu einer systemischen Infektion mit Kolonisierung von Leber und Milz (s. C.2.1). Die Infektion konnte aber von den Mäusen kontrolliert werden, was eine Elimination der Bakterien aus Leber und Milz bis Tag 12 ermöglichte (s. Abb. 8). Die Reisolierung von Δ YopP aus Dünndarm und Peyerschen Plaques war auch 3 Wochen nach Infektion noch möglich (s. Abb. 9). Für Δ YopJ in *Y. pseudotuberculosis* werden in der Literatur unterschiedliche Virulenzeigenschaften angegeben. So zeigten Galyov *et al.*, dass YopJ keine besondere Bedeutung für die Virulenz besaß (Galyov *et al.*, 1994). Eine andere Studie hingegen kam zu dem Ergebnis, dass eine Δ YopJ Mutante in *Y. pseudotuberculosis* eine starke Attenuierung aufwies (Monack *et al.*, 1998). Diese Diskrepanz ist möglicherweise auf die Verwendung von unterschiedlichen *Yersinia spp.*, verschiedenen Mausstämmen oder eine abweichende Dosierung der applizierten Bakterien zurückzuführen.

Die Ergebnisse der oralen und i.v. Infektionsversuche zeigten deutlich die unterschiedliche Bedeutung der Yop Effektorproteine für die Virulenz von *Y. enterocolitica* im Mausinfektionsmodell. So waren die Effektorproteine YopH, YopM und YopQ essentiell für die Etablierung einer systemischen Infektion in der Maus, wohingegen das Fehlen von YopE oder YopP nur zu einer geringen Einschränkung der Mausvirulenz führte (s. C.2.1). Für den Virulenzfaktor YopO konnte kein Einfluss auf den Infektionsverlauf festgestellt werden (s. C.2). YopT hat möglicherweise sogar einen hemmenden Effekt auf die Virulenz, da das Fehlen von YopT zu höheren Keimzahlen in Leber und Milz führte (s. C.2.3). Trotz der Unterschiede bei der Ausbildung einer systemischen Infektion waren alle *yop* Deletionsmutanten in der Lage, den Dünndarm und die Peyerschen Plaques über einen längeren Zeitraum zu besiedeln (s. Abb. 9).

1.3 Humorale Immunantwort auf *yop* Deletionsmutanten

Die Infektion mit *Y. enterocolitica* führt in Mäusen zur Bildung spezifischer Serumantikörper gegen Yop Proteine (Vogel *et al.*, 1993; Heesemann *et al.*, 1988). Durch Bestimmung der Antikörperantwort in einem für Yop Proteine spezifischen ELISA konnte für verschiedene attenuierte *Y. enterocolitica* Mutanten (Mutationen in den Genen *irp1*, *sodA* oder *yadA*) gezeigt werden, dass die Antikörpertiter mit dem Grad des Organbefalls in der Maus korrelieren (Igwe *et al.*, 1999). Bei diesen Untersuchungen löste die starke Infektion von Leber und Milz (Δ YadA Mutante) oder eine langanhaltende Infektion (Δ SodA Mutante) signifikant höhere Antikörpertiter aus als eine stark attenuierte Δ Irp1 Mutante, die nicht zu einer systemischen Infektion führte (Igwe *et al.*, 1999).

Die Ergebnisse der Infektionsversuche im oralen und i.v. Mausinfektionsmodell (s. C.2) ließen vermuten, dass sich die unterschiedlichen Virulenzeigenschaften der *yop* Deletionsmutanten auch auf die humorale Immunantwort in C57Bl/6 Mäusen auswirkte. Die Untersuchung der spezifischen Antikörperantwort auf Yop Überstandsproteine wurde mit den Mutanten Δ YopE, Δ YopH, Δ YopM*, Δ YopP und Δ YopQ* im Vergleich zu Δ SodA durchgeführt. Die Stämme Δ YopO und Δ YopT waren für immunologische Studien ungeeignet, da sie in ihrer Virulenz zu wenig abgeschwächt waren und die Infektionen frühzeitig zum Tod der Mäuse führten (s. C.2.1).

Alle untersuchten *yop* Deletionsmutanten waren in der Lage eine humorale Immunantwort mit messbaren IgA, IgG und IgM Titern auszulösen (s. B. 3.1.1). Trotz divergierender Virulenz konnten dabei nur unwesentliche Unterschiede bezüglich der Antikörpertiter beim Vergleich der *yop* Deletionsmutanten untereinander wie auch beim Vergleich mit Δ SodA festgestellt werden. Ein besonderer Einfluss einzelner Yop Proteine auf die humorale Immunantwort war demnach nicht erkennbar. Zieht man die Daten aus den Virulenzversuchen hinzu, so wird ersichtlich, dass eine Besiedelung von Dünndarm und Peyerschen Plaques über einen längeren Zeitraum, wie sie mit den Stämmen Δ YopH, Δ YopM* und Δ YopQ* beobachtet wurde (s. Abb. 9), für die Ausbildung einer effektiven humoralen Immunantwort auszureichen scheint.

Das immunogene Potential der einzelnen Yop Proteine wurde mit Seren, die 21 Tage nach Infektion mit *yop* Deletionsmutanten und Δ SodA genommen wurden, im Western Blot untersucht und zeigte die Bildung spezifischer Antikörper gegen YopO, YopD/V-Antigen und gegen YopP (s. C.3.1.2). YopD und V-Antigen erwiesen sich auch in früheren Studien als stark immunogen und waren in der Lage, einen wirksamen Schutz gegen eine letal verlaufende *Y. pestis* Infektion in Mäusen hervorzurufen (Andrews *et al.*, 1999). Die Bildung spezifischer Antikörper gegen YopE, YopH und YopM erfolgte dagegen in wesentlich geringerem Umfang (s. C.3.1.2).

1.4 Einfluss der Yop Effektorproteine auf Phagozytose durch dendritische Zellen

Das TTSS ermöglicht das extrazelluläre Überleben und die Proliferation von *Y. enterocolitica* in lymphatischen Organen des Wirtsorganismus. Für vier der Yop Effektorproteine (YopE, YopH, YopO und YopT) konnte eine Modifikation des Actin Zytoskelettes und nachfolgend die Hemmung der Phagozytose durch Makrophagen und PMNs gezeigt werden (Grosdent *et al.*, 2002). Der Einfluss auf die Phagozytose durch DCs, die eine der wichtigsten Stimulatoren naiver T-Zellen sind, wurde bislang nicht untersucht.

Die antiphagozytotische Rolle von YopE (44 %) und YopH (46 %) konnte auch im Rahmen dieser Arbeit für dendritische Zellen bestätigt werden (s. C.4). YopE ist ein GTPase aktivierendes Protein und führt durch Inaktivierung von Rho, Rac und Cdc42 zur Zerstörung von Actin Mikrofilamenten (Rosquist *et al.*, 1991; Andor *et al.*, 2001). Die Proteintyrosinphosphatase YopH dephosphoryliert Proteine des fokalen Adhäsionskomplexes (Fak, Paxillin, FYB, p130^{cas} und SKAP-HOM). Dies führt zur Zerstörung von fokalen

Adhäsionskomplexen und nachfolgend zur Hemmung der Phagozytose (Persson *et al.*, 1997 und 1999). Auch für Δ YopO (39 %) und Δ YopT (40 %) konnte eine erhöhte Phagozytoserate durch dendritische Zellen im Vergleich zu WA-CpYV::CM (17 %) ermittelt werden. YopO, eine Serinthreoninkinase, phosphoryliert filamentöses Actin und verhindert so die Umlagerung des Actin Zytoskelettes, die eine Voraussetzung für Phagozytose ist (Juris *et al.*, 2000). Die Hemmung der Phagozytose durch YopT erfolgt auf Grund der Freisetzung der kleinen Rho GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 aus der Verankerung in der Zellmembran (Zumbihl *et al.*, 1999; Shao *et al.*, 2002). RhoA ist notwendig für die Umlagerung von Actinfilamenten im Zusammenhang mit Phagozytose (Caron und Hall, 1998).

Für YopM und YopP wurde bislang kein Einfluss auf die Phagozytose durch Makrophagen und PMNs beschrieben und auch mit dendritischen Zellen zeigten Δ YopM (19 %) und Δ YopP (22 %) keine erhöhte Phagozytoserate. Auch für YopQ (22 %), das an der Translokation der Yop Effektorproteine beteiligt sein soll (Holmström *et al.*, 1997), konnte kein besonderer Einfluss auf die Phagozytoseresistenz von *Y. enterocolitica* mit dendritischen Zellen festgestellt werden.

2. Immunantwort auf ein heterologes Antigen

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurden die *yop* Deletionsmutanten als Impfstoffträgerstämme der YopE-Listeriolysin O Antigene verwendet. Expression und Translokation von YopE/LLO in das Zytosol eukaryontischer Zellen sowie die Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort auf das Modellantigen LLO von *L. monocytogenes* wurden untersucht. Die Immunisierung mit einem *Y. enterocolitica* basierten Impfstamm führte dabei zu einer protektiven Immunität gegen eine *Listeria* Wildtyp Infektion.

2.1 Sekretion und Translokation eines heterologen Antigens mit Hilfe des TTSS

Verschiedene Studien belegen das Potential von YopE als Transporter für heterologe Antigene (Sory *et al.*, 1995; Schesser *et al.*, 1996; Rüssmann *et al.*, 2000). Untersuchungen mit Fusionen von verkürztem YopE mit verschiedenen Proteinen zeigten ferner, dass die minimale Sequenz, die für die Sekretion von YopE erforderlich ist, die N-terminalen AS 1-15 umfasst (Sory *et al.*, 1995; Schesser *et al.*, 1996). Translokation von YopE in das Zytosol eukaryontischer Zellen erfolgte nur, wenn das Fusionsprotein über die N-terminalen AS 1-50

von YopE verfügte (Boland *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; Jacobi *et al.*, 1998). Rüssmann *et al.* verwendete verschiedene Fusionen von YopE mit p60 von *L. monocytogenes* zur Untersuchung der Antigenpräsentation und zeigte, dass auf Grund konformationeller Veränderungen im N-Terminus des Proteins ein YopE 1-138 Fusionsprotein am effizientesten transloziert wurde (Jacobi *et al.*, 1998; Rüssmann *et al.*, 2000).

Zur Untersuchung der Immunantwort auf ein heterologes Antigen wurden die *yop* Deletionsmutanten und WA-CpYV::CM mit pHR429 und pHR430 (s. C.5.1) transformiert und zunächst Expression sowie Sekretion der Fusionsproteine in den Kulturüberstand im Western Blot kontrolliert (s. B.5.1.1). Für beide Plasmide konnte bereits mit *Y. pseudotuberculosis* die Sekretion der entsprechenden Antigene in den Kulturüberstand und für pHR430 auch die Translokation des Fusionsproteins YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 in P388D1 Makrophagen nachgewiesen werden (Rüssmann *et al.*, 2003). Auch mit *Y. enterocolitica yop* Deletionsmutanten wurden Expression und Sekretion in den Kulturüberstand für beide YopE Fusionsproteine bestätigt (s. C.5.1.1). Mittels Immunfluoreszenz konnte die Translokation von YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 (pHR430) in das Zytosol von Makrophagen anhand der Δ YopPpHR430 Mutante gezeigt werden (s. C.5.1.2). Das YopE Fusionsprotein YopE₁₋₁₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 (Δ YopPpHR429), das nur über die Sekretionsdomäne verfügte, wurde hingegen nicht in das Zytosol von P388D1 Makrophagen transloziert (s. C.5.1.2).

Ein Vergleich der translozierten Proteine im Zelllysate von P388D1 Makrophagen mit den Stämmen Δ YopEpHR430, Δ YopPpHR430 und WA-CpYV::CMpHR430 mittels Western Blot zeigte keine Unterschiede hinsichtlich der Proteinmengen im Zytosol von P388D1 Makrophagen (s. C.5.1.3). Eine weitere Voraussetzung für die Auslösung einer Immunantwort auf die Plasmid kodierten Antigene ist die stabile Expression der YopE Fusionsproteine durch pHR429 und pHR430 *in vivo*. Reisolierter Bakterien wiesen auch sieben Tage nach Infektion zu 91 % Plasmid pHR429 und zu 96 % Plasmid pHR430 auf und waren in der Lage das entsprechende Protein in den Kulturüberstand zu sekretieren (s. C.5.2.1). Die Stabilität der Plasmide in *Y. enterocolitica* gewährleistete somit über einen längeren Zeitraum die Expression der YopE Fusionsproteine im Mausinfektionsmodell.

Die Untersuchungen der Sekretion und Translokation von YopE/LLO bestätigten das Potential des Typ-III-Sekretionssystems von *Y. enterocolitica*, Fremdproteine in das Zytosol von APCs zu bringen.

2.2 Humorale und zelluläre Immunantwort auf YopE/LLO *in vivo*

Die verwendeten YopE Fusionsproteine YopE₁₋₁₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 und YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 verfügten über die immundominanten Epitope LLO₉₁₋₉₉ und LLO₁₉₀₋₂₀₁ und ermöglichten die Untersuchung der CD4 und CD8 T-Zellantwort sowie der humoralen Immunantwort mit *yop* Deletionsmutanten im oralen Mausinfektionsmodell.

Untersuchungen mit den Plasmiden pHR429 und pHR430 in *Y. pseudotuberculosis* zeigten bereits für das translozierte Fusionsprotein die Induktion einer spezifischen CD4 und CD8 T-Zellantwort auf LLO im Mausinfektionsmodell (Rüssmann *et al.*, 2003). Nach Sekretion des YopE Fusionsproteins wurde mit *Y. pseudotuberculosis* dagegen weder eine CD4 noch eine CD8 T-Zellantwort beobachtet (Rüssmann *et al.*, 2003).

Obwohl Translokation des Fusionsproteins YopE₁₋₁₃₈P60₄₄₅₋₄₇₉ in P388D1 Makrophagen durch den Wildtyp WA-314 *in vitro* zu einer Antigenpräsentation im MHC Klasse-I Kontext und nachfolgend zu einer CD8 T-Zellantwort führte (Rüssmann *et al.*, 2000), konnte *in vivo* mit *Y. enterocolitica* bislang keine CD4 oder CD8 T-Zellantwort auf translozierte Antigene nachgewiesen werden. Dies führte zu der Hypothese, dass ein oder mehrere Yop Effektorproteine *in vivo* einen suppressiven Einfluss auf die Immunantwort besitzen. Der Vergleich der T-Zellantwort auf YopE/LLO nach oraler Infektion mit *yop* Deletionsmutanten sollte einen möglichen Effekt der Yop Proteine auf die Immunantwort im Wirtsorganismus nachweisen.

Tatsächlich konnte eine Beeinflussung der Immunantwort durch Inaktivierung von *yopP* im Mausinfektionsmodell nachgewiesen werden. So führte die Infektion mit den *yop* Deletionsmutanten nur mit der Δ YopP Mutante zu einer guten T-Zellantwort auf die heterologen Antigene. Sekretion von YopE/LLO durch Δ YopPpHR430 löste eine LLO₁₉₀₋₂₀₁ spezifische CD4 T-Zellantwort aus. Translokation stimulierte hingegen neben einer CD4 T-Zellantwort auch die Bildung LLO₉₁₋₉₉ spezifischer CD8 T-Zellen vergleichbar mit einer *L. monocytogenes* Wildtyp Infektion (s. C.6.2.1 und C.6.2.2).

Weder für Δ YopEpHR430, Δ YopHpHR430, Δ YopM*pHR430, Δ YopQ*pHR430 noch für eine Δ SodApHR430 Mutante konnte eine vergleichbare T-Zellantwort mit YopE/LLO *in vivo* nachgewiesen werden. Infektion mit Δ YopHpHR430, Δ YopM*pHR430 sowie Δ YopQ*pHR430 führte nur zu einer schwachen CD4 T-Zellantwort auf das translozierte Antigen, konnte jedoch keine CD8 T-Zellantwort induzieren (s. C.6.2.2). Sowohl

Δ YopEpHR430 als auch Δ SodApHR430 waren nicht in der Lage eine messbare T-Zellantwort nach oraler Infektion auszulösen (s. C.6.2).

Für die Induktion einer effektiven Immunantwort ist der Grad der Kolonisierung im Wirtsorganismus nach Infektion mit dem Lebendimpfstamm ein entscheidender Faktor (Igwe *et al.*, 1999). Die Begrenzung der Infektion auf den Dünndarm und die Peyerschen Plaques könnte ein Grund für die schwache T-Zellantwort nach Infektion mit Δ YopHpHR430, Δ YopM*pHR430, Δ YopQ*pHR430 und Δ SodApHR430 sein (s. C.2.1). Aber auch mit dem Stamm Δ YopEpHR430, der eine vergleichbare Virulenz wie Δ YopPpHR430 aufwies und zu einer systemischen Infektion führte (s. C.2.1), konnte keine effektive T-Zellantwort gegen YopE/LLO ausgelöst werden (C. 6.1.2). Um die Induktion einer T-Zellantwort auf die Deletion von *yopP* zurückzuführen und den Einfluss der Kolonisierung auf die Immunantwort zu untersuchen, wurde die T-Zellantwort auf das translozierte YopE Fusionsprotein im gleichen bakteriellen Hintergrund mit Δ SodA im Vergleich zu einer Δ SodA Δ YopP Doppelmutante bestimmt (s. C.6.2.3). Dabei konnte ein Einfluss von YopP auf die Immunantwort bestätigt werden. Trotz vergleichbarer Virulenz der Stämme (Besiedelung von Dünndarm und Peyerschen Plaques) führte nur die Infektion mit Δ SodA Δ YopPpHR430 zur Induktion einer signifikanten CD4 und CD8 T-Zellantwort. Allerdings induzierte Translokation des heterologen Antigens mit Δ YopPpHR430 (s. C.6.2.2) eine stärkere T-Zellantwort als mit der weniger virulenten Doppelmutante Δ SodA Δ YopPpHR430 (s. C.6.2.3). Besiedelung von Leber und Milz durch den Impfstamm führte somit zu einer verbesserten Immunantwort und verdeutlicht auch einen Einfluss der Kolonisierung auf die Induktion und die Stärke einer T-Zellantwort.

Ein weiterer Faktor für die Entwicklung und die Effektivität einer Immunantwort ist die Proteinmenge, die in das Zytosol von APCs transloziert wird (Rüssmann *et al.*, 2003). Für *Y. pseudotuberculosis* konnte gezeigt werden, dass Hypertranslokation eines heterologen Antigens durch eine Δ yopK Mutante zu einer stärkeren Immunantwort führte als mit Wildtyp (Rüssmann *et al.*, 2003). Um auszuschließen, dass die bessere CD4 und CD8 T-Zellantwort auf Grund einer kompensatorischen Hypertranslokation von YopE/LLO durch Δ YopP bedingt war, wurden die translozierten Proteinmengen der Stämme Δ YopEpHR430, Δ YopPpHR430 und WA-CpYV::CMpHR430 im Zelllysat von P388D1 Makrophagen mittels Western Blot untersucht (s. C.5.1.3). Unterschiede hinsichtlich der translozierten Proteinmenge konnten dabei nicht festgestellt werden.

Die Untersuchung der humoralen Immunantwort auf rekombinantes LLO bestätigte die Ergebnisse des ELISPOT-Tests. So führte Infektion mit *L. monocytogenes* Wildtyp, Δ YopPpHR430 sowie Δ SodA Δ YopPpHR430 zu signifikant höheren IgG Antikörpertitern als mit den anderen *yop* Deletionsmutanten oder Δ SodApHR430 (s. C.5.4). Die Bildung von spezifischen CD4 T-Zellen *in vivo* korrelierte erwartungsgemäß mit einer stärkeren humoralen Immunantwort auf das rekombinante LLO Protein. Wie es auch für die Auslösung einer humoralen Immunantwort gegen Yop Überstandsproteine beobachtet wurde (s. C.3.1.1), waren trotz unterschiedlicher Virulenz alle Stämme in der Lage, eine messbare Antikörperantwort auf rekombinantes LLO auszulösen.

2.3 YopP inhibiert die Antigenpräsentation *in vitro*

Die stark reduzierte T-Zellantwort bei Immunisierung mit YopP exprimierenden Stämmen könnte auf einen Defekt der Antigenpräsentation durch DCs zurückzuführen sein. Rüssmann *et al.* konnte für Wildtyp *Y. enterocolitica* durch Translokation von verschiedenen YopE/p60 Fusionsproteinen in P388D1 Makrophagen eine Antigenpräsentation im MHC-Klasse-I Kontext und die Aktivierung von spezifischen CD8 T-Zellen nachweisen (Rüssmann *et al.*, 2000). Ein Vergleich der Antigenpräsentation nach Translokation von YopE/LLO durch Wildtyp *Y. enterocolitica* oder Δ YopPpHR430 in Makrophagen zeigte jedoch keinerlei Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Dies führte zu Untersuchungen der Antigenpräsentation mit DCs, die eine wichtige Funktion für die Auslösung der adaptiven Immunantwort besitzen und eine der stärksten Stimulatoren naiver T-Zellen sind.

Die *in vitro* Antigenpräsentation des CD8 T-Zell Epitops LLO₉₁₋₉₉ durch DCs wurde mit Δ YopP, WA-CpYV::CM, Δ YopPpHR430 und WA-CpYV::CMpHR430 bestimmt (s. C.5.5). An verschiedenen Zeitpunkten und nach Infektion mit unterschiedlichen MOI führte die Translokation des heterologen Antigens durch Δ YopPpHR430 zu einer signifikant stärkeren LLO₉₁₋₉₉ spezifischen IFN- γ Bildung als mit WA-CpYV::CMpHR430 oder den Kontrollstämmen Δ YopP und WA-CpYV::CM. So konnte gezeigt werden, dass das Effektorprotein YopP *in vitro* Einfluss auf die MHC-Klasse-I Antigenpräsentation durch DCs nimmt und in der Folge eine CD8 T-Zellaktivierung hemmt.

Eine der naheliegenden Erklärungen für den inhibitorischen Effekt auf die Antigenpräsentation durch DCs war die Induktion von Apoptose durch YopP. Verschiedene Studien konnten bereits eine Auslösung von Apoptose durch YopP/J in Makrophagen

nachweisen (Mills *et al.*, 1997; Monack *et al.*, 1997; Ruckdeschel *et al.*, 1998). Um herauszufinden, ob die Hemmung der Antigenpräsentation durch YopP auf die Induktion von Apoptose in DCs zurückzuführen war, wurde die Anzahl apoptotischer DCs nach Infektion mit Δ YopP und WA-CpYV::CM bestimmt (s. C.5.6). Schon 3 h nach Infektion mit WA-CpYV::CM waren die Hälfte und weitere 2 h fast alle DCs apoptotisch. Dagegen führte Deletion von *yopP* zu einer deutlichen Reduktion apoptotischer Zellen im Vergleich zu WA-CpYV::CM (s. C.5.6). Der Versuch zeigte die Induktion von Apoptose in DCs durch den Effektor YopP, was eine mögliche Erklärung für die Hemmung der Antigenpräsentation *in vitro* sein könnte.

Interaktionen von DCs mit *Yersinia* führten auch in früheren Studien zu einer Abnahme der immunstimulatorischen Aktivität von DCs und zeigten einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von T-Zellen (Schoppet *et al.*, 2000 und 2001). Induktion von Apoptose oder Nekrose durch *Yersinia* wurde jedoch auch nach mehreren Tagen nicht beobachtet. Dieser Unterschied ist möglicherweise auf die Verwendung des weniger virulenten Serotyps O:3 zurückzuführen, der im Vergleich zu Serotyp O:8 in wesentlich geringerem Umfang Apoptose in Makrophagen auslöste (Ruckdeschel *et al.*, 2001). Da weder primäre T-Zelllinien noch T-Zell Hybridome empfänglich für YopP/J vermittelte Apoptose waren (Yao *et al.*, 1999), haben wahrscheinlich DCs die größte Bedeutung als Zielzellen für die immunmodulatorische Aktivität und die Auslösung von Apoptose durch YopP. Deshalb vermuten wir, dass Induktion von Apoptose verantwortlich ist für die Hemmung der CD8 T-Zellantwort *in vivo* und der Antigenpräsentation *in vitro*.

2.4 Δ YopP Lebendimpfstoff vermittelt Schutz vor einer *Listeria* Wildtyp Infektion

Die Inaktivierung von *yopP* ermöglichte schließlich die Verwendung von *Y. enterocolitica* als Impfstamm zur Erzeugung einer Immunität gegen eine *L. monocytogenes* Wildtyp Infektion. So vermittelte eine einmalige orale Immunisierung mit Δ YopPpHR430 einen Schutz gegen eine *Listeria* Infektion und führte drei Tage nach i.v. Infektion mit *L. monocytogenes* zu einer signifikanten Reduktion der Keimzahlen in der Milz verglichen mit Δ YopEpHR430, Δ SodApHR430 und Δ YopP (s. C.6.). Translokation des heterologen Antigens durch Δ YopPpHR430 in das Zytosol von Wirtszellen imitierte dabei eine *Listeria* Wildtyp Infektion und induzierte die Bildung von spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen vergleichbar mit der T-Zellantwort auf LLO nach subletaler Infektion mit *L. monocytogenes* (s. C.5.3.2). Dennoch

vermittelte die Immunisierung mit einem einzelnen immundominanten *Listeria* Antigen (LLO) nicht den gleichen Schutz wie eine subletale Infektion mit Wildtyp *L. monocytogenes*, die zu einer fast vollständigen Elimination der Bakterien aus der Milz führte (s. C.6). Vermutlich kommt es nach Immunisierung mit dem intrazellulären Erreger *Listeria* zur Präsentation verschiedener immunogener Proteine im Wirtsorganismus, die nachfolgend eine CD4 und CD8 T-Zellantwort auf eine Vielzahl von *Listeria* Antigenen auslöst (Rüssmann *et al.*, 2001; Škoberne *et al.*, 2002). Ein potenter Impfstamm sollte deshalb in der Lage sein, gleichzeitig mehrere Antigene in das Zytosol von APCs zu bringen, um einen vollständigen Schutz gegen eine *Listeria* Infektion zu gewährleisten.

Rüssmann *et al.* verwendete *Y. pseudotuberculosis* und den intrazellulären Erreger *S. typhimurium* zur Untersuchung der Immunantwort und des protektiven Potentials von sekretierten und translozierten YopE/LLO und YopE/p60 Fusionsproteinen (Rüssmann *et al.*, 2001 und 2003). Mit *Salmonella* führte die Sekretion von YopE/LLO nur zu einer schwachen CD8 T-Zellantwort und zu einer leichten Reduktion der *Listeria* Keimzahlen in der Milz. Translokation von YopE/LLO hingegen vermittelte eine lang anhaltende protektive Immunität gegen Listeriose basierend auf der Induktion einer CD8 T-Zellantwort gegen das heterologe Antigen (Rüssmann *et al.*, 2001). Mit *Y. pseudotuberculosis* kam es nur nach Translokation von YopE/LLO zu einer T-Zellantwort mit der Bildung CD4 und CD8 spezifischer T-Zellen, die einen partiellen Schutz gegen eine *Listeria* Wildtyp Infektion vermittelten (Rüssmann *et al.*, 2003). Die Induktion spezifischer CD4 T-Zellen nach Translokation wurde mit Salmonellen nicht beobachtet und scheint eine Besonderheit von Yersinien zu sein. Unklar ist allerdings, wie es nach Translokation des heterologen Antigens zur Antigenpräsentation in einem MHC-Klasse-II Kontext und so zur Induktion von spezifischen CD4 T-Zellen kommt, da intrazelluläre Proteine üblicherweise in einem MHC-Klasse-I Kontext prozessiert werden und zu einem CD8 T-Zellpriming führen (s. Abb. 30) (Rüssmann *et al.*, 2003). Dennoch zeigen die Ergebnisse sowohl für *Y. pseudotuberculosis* als auch für *Y. enterocolitica* (s. C.6.) eine stärkere CD4 T-Zellantwort auf das translozierte im Vergleich zum sekretierten Fusionsprotein. Tatsächlich konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass einige der MHC-Klasse-II prozessierten Peptide durchaus einen intrazellulären Ursprung besitzen (Lechler *et al.*, 1996; Rudensky *et al.*, 1991). Eine weitere Erklärung für dieses Phänomen ist möglicherweise eine Kreuzpräsentation („Cross Presentation“) des heterologen Antigens durch so genannte „bystander“ Zellen. Kreuzpräsentation ist ein alternativer Weg der Antigenpräsentation, bei dem Makrophagen oder DCs apoptotische oder nekrotische Zellen

phagozytieren. Endosomale Prozessierung der phagozytierten Peptide (z.B. translozierte Antigene) und Präsentation im MHC-Klasse-II Kontext führt dann zu einer CD4 T-Zellantwort. Dieser Mechanismus ist vermutlich auch für die Auslösung einer starken CD4 T-Zellantwort auf LLO nach *Listeria* Wildtyp Infektion verantwortlich (Škoberne *et al.*, 2002).

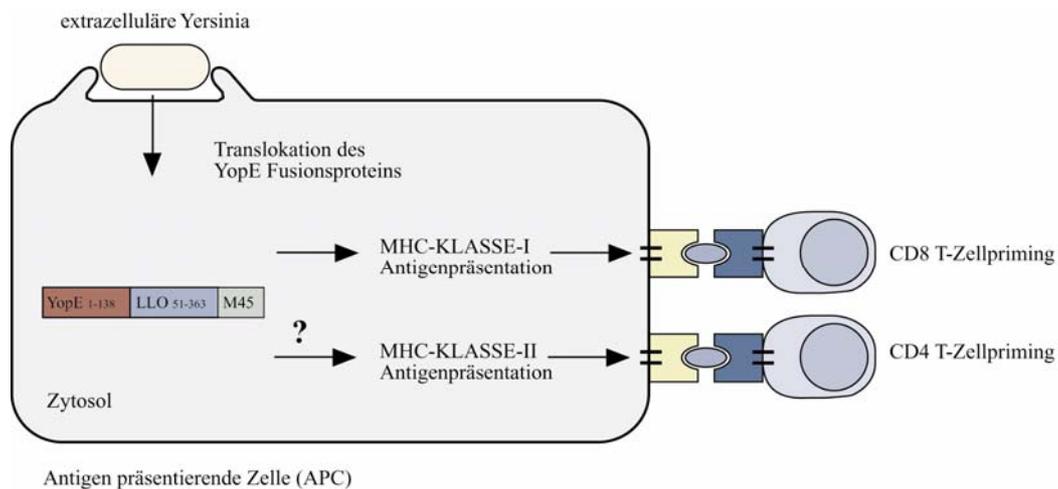


Abb. 30: Schematische Darstellung der Translokation eines heterologen Antigens durch *Y. enterocolitica*: Mit Hilfe des Typ-III-Sekretionsapparats wird das heterologe Antigen durch extrazelluläre *Yersinia* in das Zytosol von APCs transloziert. Die Präsentation des degradierten Antigens in einem MHC-Klasse-I Kontext an der Zellmembran führt zu einem Antigen spezifischen CD8 T-Zellpriming. Wie es nach Translokation des heterologen Antigens zur Bildung spezifischer CD4 T-Zellen kommt, ist bislang noch unklar.

Die Ergebnisse der Immunantwort nach Inaktivierung von *yopP* sind in Übereinstimmung mit dem Infektionsmodell von *Yersinia*. Demnach induzieren extrazelluläre Yersinien Apoptose in APCs und führen durch Hemmung der Antigenpräsentation zu einem „stillen“, nicht immunogenen Tod der Zellen. Allerdings führte Apoptose Induktion durch *Mycobacterium tuberculosis* und *S. typhimurium* zu einer spezifischen CD8 T-Zellantwort durch Kreuzpräsentation apoptotischer Vesikel mit „bystander“ Zellen (DCs) (Schaible *et al.*, 2003; Yrlid *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den intrazellulären Erregern besitzt offensichtlich die Induktion von Apoptose durch extrazelluläre Yersinien einen hemmenden Einfluss auf die Immunantwort. Das synergistische Zusammenspiel von antiphagozytären und immunmodulatorischen Yops während einer *Yersinia* Infektion inhibiert dabei möglicherweise „bystander“ Zellen und verhindert so eine Kreuzpräsentation von

apoptotischen Zellfragmenten. Dadurch könnte die Auslösung einer effektiven T-Zellantwort unterdrückt werden.

Die Bedeutung und der Nutzen einer Hemmung der CD8 T-Zellantwort im Wirtsorganismus durch extrazelluläre Yersinien ist nicht ganz klar ersichtlich. CD8 T-Zellen führen zur Lyse von infizierten Zellen und zur Freisetzung von intrazellulären Bakterien in extrazelluläre Kompartimente, wo sie dann z.B. durch aktivierte Makrophagen phagozytiert und dem Immunsystem präsentiert werden. Denkbar ist, dass CD8 T-Zellen über eine direkte bakterizide Aktivität gegenüber *Yersinia* verfügen. Ein solcher Effekt wurde für Granulysin von CD8 T-Zellen beschrieben, die extrazelluläre *M. tuberculosis* abtöteten (Stenger *et al.*, 1998). Möglicherweise überlebt und proliferiert *Y. enterocolitica* aber auch zu einem bestimmten Zeitpunkt der Infektion intrazellulär, wie es für *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* vermutet wurde (Janssen und Surgalla, 1969; Pujol und Bliska, 2003).

Darüber hinaus scheint eine Hemmung der Zytolyse von infizierten Wirtszellen, die durch Translokation von Yops eine Modifikation ihrer Zellfunktionen erfahren haben, vorteilhaft für *Yersinia* zu sein, da dadurch eine T-Zell vermittelte Freisetzung von Zytokinen und die Aktivierung proinflammatorischer Prozesse unterdrückt wird. So konnte gezeigt werden, dass die Bildung von IFN- γ , das unter anderem Makrophagen aktiviert, ein entscheidender Faktor für die Elimination von Yersinien aus dem Wirtsorganismus ist (Autenrieth *et al.*, 1994; Igwe *et al.*, 1999).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen das Potential von *Y. enterocolitica*, mit Hilfe des Typ-III-Sekretionsapparats heterologe Antigene in das Zytosol von eukaryontischen Zellen zu translozieren. Erst die Inaktivierung des Effektorproteins YopP verstärkte dabei das immunogene Potential von *Y. enterocolitica* und führte zur Induktion einer spezifischen CD4 und CD8 T-Zellantwort auf ein heterologes Antigen in vivo sowie zu einer in vitro Antigenpräsentation im MHC-Klasse-I Kontext. Erstmals konnte gezeigt werden, dass *Y. enterocolitica* als oraler Impfstamm genutzt werden kann, um eine protektive Immunität gegen einen intrazellulären Erreger hervorzurufen. Der Einfluss von YopP auf die Immunantwort bietet einen möglichen Ansatz für die Entwicklung neuer *Y. enterocolitica* basierter Impfstoffe, die durch Translokation von heterologen Antigenen zu einer spezifischen CD4 und CD8 T-Zellantwort führen.

E. Zusammenfassung

Die Pathogenität von *Y. enterocolitica* O:8 ist gekoppelt an das Vorhandensein des 70 kb großen Virulenzplasmides (pYV), das für die Gene eines Typ-III-Sekretionssystems kodiert und die Translokation von 6 Yop Effektorproteinen (YopE, YopH, YopM, YopO, YopP und YopT) in das Zytosol eukaryontischer Zellen ermöglicht. Intrazellulär interagieren Yops dabei mit verschiedenen Zellstrukturen und Signaltransduktionskaskaden, wodurch es zu einer Modulation der Immunantwort im Wirtsorganismus kommt.

Durch systematische Mutagenese der *yop*-Gene und Untersuchung der *yop* Deletionsmutanten im Mausinfektionsmodell konnte in dieser Arbeit ein Einfluss der Yops auf die Virulenz und die Auslösung einer Immunantwort nachgewiesen werden. Die Translokation eines heterologen Antigens (YopE/LLO) durch das Typ-III-Sekretionssystem führte zur Induktion einer spezifischen CD4 und CD8 T-Zellantwort gegen Listeriolysin O (LLO) und ermöglichte die Verwendung von *Y. enterocolitica* als oralen Lebendimpfstoff zur Immunisierung gegen eine *Listeria* Wildtyp Infektion.

Die Mutagenese der *yop* Deletionsmutanten konnte durch Verwendung einer neuen Rekombinationsmethode (ET-Klonierung) direkt in *Yersinia* durchgeführt werden. Es wurden sieben genetisch stabile *yop* Deletionsmutanten (Δ YopE, Δ YopH, Δ YopM, Δ YopO, Δ YopP, Δ YopQ und Δ YopT) generiert und ihr Einfluss auf die Virulenz im Vergleich zu WAcpYV::CM im oralen und i.v. Mausinfektionsmodell untersucht.

Sowohl für YopO als auch für YopT konnte kein wesentlicher Effekt auf den Infektionsverlauf festgestellt werden. YopT hat möglicherweise sogar eine hemmende Wirkung auf die Virulenz von *Y. enterocolitica* in der Maus, da das Fehlen von YopT zu höheren Keimzahlen in Leber und Milz führte. Nach Inaktivierung von *yopE* oder *yopP* kam es hingegen zu einer geringen Einschränkung der Mausvirulenz. Die Effektorproteine YopH, YopM und YopQ erwiesen sich als essentiell für die Etablierung einer systemischen Infektion, da durch Deletion der entsprechenden Gene eine deutliche Reduktion der Keimzahlbelastung in der Maus erfolgte.

Trotz unterschiedlicher Kolonisierung der Maus waren alle *yop* Deletionsmutanten in der Lage, eine vergleichbare Antikörperantwort (IgA, IgG, IgM) gegen Yop Kulturüberstandspoteine auszulösen. Für die Inaktivierung der Effektorproteine YopE, YopH, YopO und YopT konnte eine verstärkte Phagozytose durch dendritische Zellen nachgewiesen werden.

Die Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort auf ein heterologes Antigen erfolgte mit einer Fusion von YopE₁₋₁₃₈ und dem Modellantigen LLO von *L. monocytogenes*. Expression sowie Translokation von YopE/LLO durch die *yop* Deletionsmutanten in das Zytosol von eukaryontischen Zellen wurden untersucht. *In vivo* führte die Translokation von YopE/LLO nur nach Inaktivierung von *yopP* zur Induktion einer spezifischen CD4 und CD8 T-Zellantwort. Untersuchungen der *in vitro* T-Zellantwort auf das CD8 T-Zell Epitop LLO₉₁₋₉₉ in dendritischen Zellen zeigten eine Hemmung der Antigenpräsentation im MHC-Klasse-I Kontext durch den Effektor YopP. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass YopP Apoptose in dendritischen Zellen induziert, was eine mögliche Ursache für das Fehlen der T-Zellantwort *in vivo* und der Antigenpräsentation *in vitro* ist. Die Infektion mit Δ YopP löste im Vergleich zu den anderen *yop* Deletionsmutanten eine stärkere Antikörperbildung gegen rekombinantes LLO aus.

Eine einmalige orale Immunisierung mit der Δ YopP Mutante führte nach Translokation von YopE/LLO zu einer signifikanten Reduktion der *Listeria* Keimzahlen in der Milz und vermittelte einen Schutz gegen eine *Listeria* Wildtyp Infektion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen das Potential von *Y. enterocolitica* durch Translokation eines heterologen Antigens, eine protektive Immunität gegen einen intrazellulären Erreger auszulösen. Der Einfluss von YopP auf die Immunantwort bietet einen möglichen Ansatz für die weitere Entwicklung von *Y. enterocolitica* basierten Impfstoffen mit abgeschwächter Virulenz und einer effektiven humoralen und zellulären Immunantwort.

Literaturverzeichnis

- Aleksic, S. and Bockemühl, J.** (1990). Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. *Immun. Infekt.* **18**, 178-185.
- Andor, A., Trulzsch, K., Essler, M., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Heesemann, J., and Aepfelbacher, M.** (2001). YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol.* **3**, 301-310.
- Andrews, G. P., Strachan, S. T., Benner, G. E., Sample, A. K., Anderson, G. W., Jr., Adamovicz, J. J., Welkos, S. L., Pullen, J. K., and Friedlander, A. M.** (1999). Protective efficacy of recombinant *Yersinia* outer proteins against bubonic plague caused by encapsulated and nonencapsulated *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* **67**, 1533-1537.
- Autenrieth, I. B., Tingle, A., Reske-Kunz, A., and 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., Bohn, E., Kaufmann, S. H., and Heesemann, J.** (1994). Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. *Infect. Immun.* **62**, 2590-2599.
- Autenrieth, I. B., Bohn, E., Ewald, J. H., and Heesemann, J.** (1995). Deferoxamine B but not deferoxamine G1 inhibits cytokine production in murine bone marrow macrophages. *J. Infect. Dis.* **172**, 490-496.
- Autenrieth, I. B. and Firsching, R.** (1996). Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *J. Med. Microbiol.* **44**, 285-294.
- Azuma, M., Yssel, H., Phillips, J. H., Spits, H., and Lanier, L. L.** (1993). Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **177**, 845-850.
- Barz, C., Abahji, T. N., Trulzsch, K., and Heesemann, J.** (2000). The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1. *FEBS Lett.* **482**, 139-143.
- Baumler, A. J. and Hantke, K.** (1992). Ferrioxamine uptake in *Yersinia enterocolitica*: characterization of the receptor protein FoxA. *Mol. Microbiol.* **6**, 1309-1321.
- Bengoechea, J. A., Lindner, B., Seydel, U., Diaz, R., and Moriyon, I.** (1998). *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* are more resistant to bactericidal cationic peptides than *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology* **144** (Pt 6), 1509-1515.
- Black, D. S. and Bliska, J. B.** (1997). Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J.* **16**, 2730-2744.
- Black, D. S., Marie-Cardine, A., Schraven, B., and Bliska, J. B.** (2000). The *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH targets a novel adhesion-regulated signalling complex in macrophages. *Cell Microbiol.* **2**, 401-414.

- Bliska, J. B., Copass, M. C., and Falkow, S.** (1993). The Yersinia pseudotuberculosis adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells. *Infect.Immun.* **61**, 3914-3921.
- Boland, A., Sory, M. P., Iriarte, M., Kerbouch, C., Wattiau, P., and Cornelis, G. R.** (1996). Status of YopM and YopN in the Yersinia Yop virulon: YopM of Y. enterocolitica is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J.* **15**, 5191-5201.
- Bottone, E. J.** (1997). Yersinia enterocolitica: the charisma continues. *Clin.Microbiol.Rev.* **10**, 257-276.
- Braun, V., Hantke, K., and Koster, W.** (1998). Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met.Ions.Biol.Syst.* **35**, 67-145.
- Brenner, D. J.** (1979). Speciation in Yersinia. *Contrib.Microbiol.Immunol.* **5**, 33-43.
- Carniel, E., Guilvout, I., and Prentice, M.** (1996). Characterization of a large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B Yersinia enterocolitica. *J.Bacteriol.* **178**, 6743-6751.
- Caron, E. and Hall, A.** (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**, 1717-1721.
- Chaux, P., Luiten, R., Demotte, N., Vantomme, V., Stroobant, V., Traversari, C., Russo, V., Schultz, E., Cornelis, G. R., Boon, T., and van der, B. P.** (1999). Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1. *J.Immunol.* **163**, 2928-2936.
- China, B., Sory, M. P., N'Guyen, B. T., de Bruyere, M., and Cornelis, G. R.** (1993). Role of the YadA protein in prevention of opsonization of Yersinia enterocolitica by C3b molecules. *Infect.Immun.* **61**, 3129-3136.
- Collazo, C.M., and Galan, J.E.** (1997) The invasion type III system of Salmonella typhimurium directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol. Microbiol.* **24**, 747-756
- Cornelis, G. R.** (1998). The Yersinia deadly kiss. *J.Bacteriol.* **180**, 5495-5504.
- Cornelis, G. R.** (2002). Yersinia type III secretion: send in the effectors. *J.Cell Biol.* **158**, 401-408.
- Cornelis, G. R.** (2002). The Yersinia Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 742-752.
- Cornelis, G. R.** (2002). The Yersinia Ysc-Yop virulence apparatus. *Int.J.Med.Microbiol.* **291**, 455-462.
- Curtiss, R., III, Kelly, S. M., Tinge, S. A., Tacket, C. O., Levine, M. M., Srinivasan, J., and Koopman, M.** (1994). Recombinant Salmonella vectors in vaccine development. *Dev.Biol.Stand.* **82**, 23-33.

- Datsenko, K. A. and 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.
- Delor, I. and Cornelis, G. R.** (1992). Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect.Immun.* **60**, 4269-4277.
- Dequeker, J., Jamar, R., and Walravens, M.** (1980). HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection. *J.Rheumatol.* **7**, 706-710.
- Dersch, P. and Isberg, R. R.** (2000). An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors. *Infect.Immun.* **68**, 2930-2938.
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145.
- Dukuzumuremyi, J. M., Rosqvist, R., Hallberg, B., Akerstrom, B., Wolf-Watz, H., and Schesser, K.** (2000). The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J.Biol.Chem.* **275**, 35281-35290.
- Dunne, M., al Ramadi, B. K., Barthold, S. W., Flavell, R. A., and Fikrig, E.** (1995). Oral vaccination with an attenuated *Salmonella typhimurium* strain expressing *Borrelia burgdorferi* OspA prevents murine Lyme borreliosis. *Infect.Immun.* **63**, 1611-1614.
- Frederiksen, W.** (1964). A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella X*). *Proc. 14th. Scand. Congr. Path. Microbiol.* **108**.
- Gaede, K., Nazet, M., Bosse, D., Hunig, and Heesemann, J.** (1995). Treatment of arthritis in Lewis rats by a monoclonal antibody against alpha beta T cell receptor: differential sensitivity of *Yersinia*-induced arthritis versus adjuvant arthritis. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **77**, 339-348.
- Galyov, E. E., Hakansson, S., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H.** (1993). A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**, 730-732.
- Galyov, E. E., Hakansson, S., and Wolf-Watz, H.** (1994). Characterization of the operon encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J.Bacteriol.* **176**, 4543-4548.
- Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P., and Cornelis, G. R.** (2002). Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect.Immun.* **70**, 4165-4176.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
- Heesemann, J., Algermissen, B., and Laufs, R.** (1984). Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **46**, 105-110.

- Heesemann, J., Gross, U., Schmidt, N., and Laufs, R.** (1986). Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media. *Infect.Immun.* **54**, 561-567.
- Heesemann, J., Schroder, J., and Ulrich, M.** (1988). Analysis of the class-specific immune response to *Yersinia enterocolitica* virulence-associated antigens in oro-gastrically infected rabbits. *Microb.Pathog.* **5**, 437-447.
- Heesemann, J., Hantke, K., Vocke, T., Saken, E., Rakin, A., Stojiljkovic, I., and Berner, R.** (1993). Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Mol.Microbiol.* **8**, 397-408.
- Hinman, A. R.** (1998). Global progress in infectious disease control. *Vaccine* **16**, 1116-1121.
- Holmstrom, A., Rosqvist, R., Wolf-Watz, H., and Forsberg, A.** (1995). Virulence plasmid-encoded YopK is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* to cause systemic infection in mice. *Infect.Immun.* **63**, 2269-2276.
- Holmstrom, A., Petterson, J., Rosqvist, R., Hakansson, S., Tafazoli, F., Fallman, M., Magnusson, K. E., Wolf-Watz, H., and Forsberg, A.** (1997). YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Mol.Microbiol.* **24**, 73-91.
- Holmstrom, A., Olsson, J., Cherepanov, P., Maier, E., Nordfelth, R., Pettersson, J., Benz, R., Wolf-Watz, H., and Forsberg, A.** (2001). LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol.Microbiol.* **39**, 620-632.
- Hueck, C. J.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 379-433.
- Igwe, E. I., Russmann, H., Roggenkamp, A., Noll, A., Autenrieth, I. B., and Heesemann, J.** (1999). Rational live oral carrier vaccine design by mutating virulence-associated genes of *Yersinia enterocolitica*. *Infect.Immun.* **67**, 5500-5507.
- Igwe, E. I., Geginat, G., and Russmann, H.** (2002). Concomitant cytosolic delivery of two immunodominant listerial antigens by *Salmonella enterica* serovar typhimurium confers superior protection against murine listeriosis. *Infect.Immun.* **70**, 7114-7119.
- Iriarte, M. and Cornelis, G. R.** (1998). YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol.Microbiol.* **29**, 915-929.
- Jacobi, C. A., Roggenkamp, A., Rakin, A., Zumbihl, R., Leitritz, L., and Heesemann, J.** (1998). In vitro and in vivo expression studies of yopE from *Yersinia enterocolitica* using the gfp reporter gene. *Mol.Microbiol.* **30**, 865-882.
- Janssen, W. A. and Surgalla, M. J.** (1969). Plague bacillus: survival within host phagocytes. *Science* **163**, 950-952.
- Juris, S. J., Rudolph, A. E., Huddler, D., Orth, K., and Dixon, J. E.** (2000). A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 9431-9436.

- Karem, K. L., Bowen, J., Kuklin, N., and Rouse, B. T.** (1997). Protective immunity against herpes simplex virus (HSV) type 1 following oral administration of recombinant Salmonella typhimurium vaccine strains expressing HSV antigens. *J.Gen.Virol.* **78 (Pt 2)**, 427-434.
- Kempf, V. A., Bohn, E., Noll, A., Bielfeldt, C., and Autenrieth, I. B.** (1998). In vivo tracking and protective properties of Yersinia-specific intestinal T cells. *Clin.Exp.Immunol.* **113**, 429-437.
- Kerschen, E. J., Cohen, D. A., Kaplan, A. M., and Straley, S. C.** (2004). The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect.Immun.* **72**, 4589-4602.
- Knapp, W.** (1988) Die Gattung Yersinia – Yersiniosen. In H. Brandis und G. Pulverer (ed.), *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie*.
- Koebnik, R., Baumler, A. J., Heesemann, J., Braun, V., and Hantke, K.** (1993). The TonB protein of Yersinia enterocolitica and its interactions with TonB-box proteins. *Mol.Gen.Genet.* **237**, 152-160.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lechler, R., Aichinger, G., and Lightstone, L.** (1996). The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation. *Immunol.Rev.* **151**, 51-79.
- Lee, V. T., Anderson, D. M., and Schneewind, O.** (1998). Targeting of Yersinia Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol.Microbiol.* **28**, 593-601.
- Leung, K. Y. and Straley, S. C.** (1989). The yopM gene of Yersinia pestis encodes a released protein having homology with the human platelet surface protein GPIb alpha. *J.Bacteriol.* **171**, 4623-4632.
- Levine, M. M.** (1983). Travellers' diarrhoea: prospects for successful immunoprophylaxis. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl* **84**, 121-134.
- Levine, M. M., Galen, J., Barry, E., Noriega, F., Chatfield, S., Sztein, M., Dougan, G., and Tacket, C.** (1996). Attenuated Salmonella as live oral vaccines against typhoid fever and as live vectors. *J.Biotechnol.* **44**, 193-196.
- Lian, C. J., Hwang, W. S., and Pai, C. H.** (1987). Plasmid-mediated resistance to phagocytosis in Yersinia enterocolitica. *Infect.Immun.* **55**, 1176-1183.
- Liu, M. A.** (2003). DNA vaccines: a review. *J.Intern.Med.* **253**, 402-410.
- Logsdon, L. K. and Mecsas, J.** (2003). Requirement of the Yersinia pseudotuberculosis effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues. *Infect.Immun.* **71**, 4595-4607.
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G.** (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J.Immunol.Methods* **223**, 77-92.

- Marranzano, M., Agodi, A., and Gulisano, M.** (1993). Molecular characterization of Yersinia strains isolated from human and environmental sources. *New Microbiol.* **16**, 57-62.
- McDonald, C., Vacratsis, P. O., Bliska, J. B., and Dixon, J. E.** (2003). The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases. *J.Biol.Chem.* **278**, 18514-18523.
- Medina, E., Paglia, P., Nikolaus, T., Muller, A., Hensel, M., and Guzman, C. A.** (1999). Pathogenicity island 2 mutants of Salmonella typhimurium are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. *Infect.Immun.* **67**, 1093-1099.
- Medina, E., Paglia, P., Rohde, M., Colombo, M. P., and Guzman, C. A.** (2000). Modulation of host immune responses stimulated by Salmonella vaccine carrier strains by using different promoters to drive the expression of the recombinant antigen. *Eur.J.Immunol.* **30**, 768-777.
- Medina, E. and Guzman, C. A.** (2000). Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **27**, 305-311.
- Medina, E. and Guzman, C. A.** (2001). Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* **19**, 1573-1580.
- Mills, S. D., Boland, A., Sory, M. P., van der, S. P., Kerbourn, C., Finlay, B. B., and Cornelis, G. R.** (1997). Yersinia enterocolitica induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 12638-12643.
- Monack, D. M., Meccas, J., Ghori, N., and Falkow, S.** (1997). Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 10385-10390.
- Monack, D. M., Meccas, J., Bouley, D., and Falkow, S.** (1998). Yersinia-induced apoptosis in vivo aids in the establishment of a systemic infection of mice. *J.Exp.Med.* **188**, 2127-2137.
- Mulder, B., Michiels, T., Simonet, M., Sory, M. P., and Cornelis, G.** (1989). Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of Yersinia enterocolitica W227. *Infect.Immun.* **57**, 2534-2541.
- Nakajima, R., Motin, V. L., and Brubaker, R. R.** (1995). Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect.Immun.* **63**, 3021-3029.
- Neyt, C. and Cornelis, G. R.** (1999). Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by Yersinia enterocolitica: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol.Microbiol.* **33**, 971-981.
- Orth, K., Palmer, L. E., Bao, Z. Q., Stewart, S., Rudolph, A. E., Bliska, J. B., and Dixon, J. E.** (1999). Inhibition of the mitogen-activated protein kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science* **285**, 1920-1923.
- Pepe, J. C. and Miller, V. L.** (1993). The biological role of invasin during a Yersinia enterocolitica infection. *Infect.Agents Dis.* **2**, 236-241.

- Pepe, J. C., Wachtel, M. R., Wagar, E., and Miller, V. L.** (1995). Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect.Immun.* **63**, 4837-4848.
- Persson, C., Carballeira, N., Wolf-Watz, H., and Fallman, M.** (1997). The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J.* **16**, 2307-2318.
- Persson, C., Nordfelth, R., Andersson, K., Forsberg, A., Wolf-Watz, H., and Fallman, M.** (1999). Localization of the *Yersinia* PTPase to focal complexes is an important virulence mechanism. *Mol.Microbiol.* **33**, 828-838.
- Pouwels, P. H., Leer, R. J., Shaw, M., Heijne den Bak-Glashouwer MJ, Tielen, F. D., Smit, E., Martinez, B., Jore, J., and Conway, P. L.** (1998). Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int.J.Food Microbiol.* **41**, 155-167.
- Pujol, C. and Bliska, J. B.** (2003). The ability to replicate in macrophages is conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect.Immun.* **71**, 5892-5899.
- Rabson, A. R., Hallett, A. F., and Koornhof, H. J.** (1975). Generalized *Yersinia enterocolitica* infection. *J.Infect.Dis.* **131**, 447-451.
- Reisner, B. S. and Straley, S. C.** (1992). *Yersinia pestis* YopM: thrombin binding and overexpression. *Infect.Immun.* **60**, 5242-5252.
- Roggenkamp, A., Bittner, T., Leitritz, L., Sing, A., and Heesemann, J.** (1997). Contribution of the Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O8. *Infect.Immun.* **65**, 4705-4710.
- Roggenkamp, A., Geiger, A. M., Leitritz, L., Kessler, A., and Heesemann, J.** (1997). Passive immunity to infection with *Yersinia* spp. mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen. *Infect.Immun.* **65**, 446-451.
- Rosqvist, R., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H.** (1991). Microinjection of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Biochem.Soc.Trans.* **19**, 1131-1132.
- Rosqvist, R., Magnusson, K. E., and Wolf-Watz, H.** (1994). Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* **13**, 964-972.
- Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S., and Heesemann, J.** (1996). Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect.Immun.* **64**, 724-733.
- Ruckdeschel, K., Harb, S., Roggenkamp, A., Hornef, M., Zumbihl, R., Kohler, S., Heesemann, J., and Rouot, B.** (1998). *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J.Exp.Med.* **187**, 1069-1079.

- Ruckdeschel, K., Mannel, O., Richter, K., Jacobi, C. A., Trulzsch, K., Rouot, B., and Heesemann, J.** (2001). Yersinia outer protein P of Yersinia enterocolitica simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. *J.Immunol.* **166**, 1823-1831.
- Rudensky, A. Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., Barlow, A., and Janeway, C. A., Jr.** (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**, 622-627.
- Russmann, H., Shams, H., Poblete, F., Fu, Y., Galan, J. E., and Donis, R. O.** (1998). Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. *Science* **281**, 565-568.
- Russmann, H., Weissmuller, A., Geginat, G., Igwe, E. I., Roggenkamp, A., Bubert, A., Goebel, W., Hof, H., and Heesemann, J.** (2000). Yersinia enterocolitica-mediated translocation of defined fusion proteins to the cytosol of mammalian cells results in peptide-specific MHC class I-restricted antigen presentation. *Eur.J.Immunol.* **30**, 1375-1384.
- Russmann, H., Igwe, E. I., Sauer, J., Hardt, W. D., Bubert, A., and Geginat, G.** (2001). Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant Salmonella expressing hybrid Yersinia type III proteins. *J.Immunol.* **167**, 357-365.
- Russmann, H., Gerdemann, U., Igwe, E. I., Panthel, K., Heesemann, J., Garbom, S., Wolf-Watz, H., and Geginat, G.** (2003). Attenuated Yersinia pseudotuberculosis carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction. *Infect.Immun.* **71**, 3463-3472.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sauvonnet, N., Pradet-Balade, B., Garcia-Sanz, J. A., and Cornelis, G. R.** (2002). Regulation of mRNA expression in macrophages after Yersinia enterocolitica infection. Role of different Yop effectors. *J.Biol.Chem.* **277**, 25133-25142.
- Schaible, U. E., Winau, F., Sieling, P. A., Fischer, K., Collins, H. L., Hagens, K., Modlin, R. L., Brinkmann, V., and Kaufmann, S. H.** (2003). Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat.Med.* **9**, 1039-1046.
- Schesser, K., Frithz-Lindsten, E., and Wolf-Watz, H.** (1996). Delineation and mutational analysis of the Yersinia pseudotuberculosis YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *J.Bacteriol.* **178**, 7227-7233.
- Schodel, F. and Curtiss, R., III** (1995). Salmonellae as oral vaccine carriers. *Dev.Biol.Stand.* **84**, 245-253.
- Schoppet, M., Bubert, A., and Huppertz, H. I.** (2000). Dendritic cell function is perturbed by Yersinia enterocolitica infection in vitro. *Clin.Exp.Immunol.* **122**, 316-323.
- Schoppet, M. and Huppertz, H. I.** (2001). Differential stimulation of helper and cytotoxic T cells by dendritic cells after infection by Yersinia enterocolitica in vitro. *Cell Immunol.* **208**, 43-51.

- Schorr, J., Knapp, B., Hundt, E., Kupper, H. A., and Amann, E.** (1991). Surface expression of malarial antigens in *Salmonella typhimurium*: induction of serum antibody response upon oral vaccination of mice. *Vaccine* **9**, 675-681.
- Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., Kirsch, T., Swoboda, B., Bull, C., Goodman, S., and Emmrich, F.** (1993). Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect.Immun.* **61**, 2513-2519.
- Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W., and Dixon, J. E.** (2002). A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**, 575-588.
- Simonet, M., Richard, S., and Berche, P.** (1990). Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid. *Infect.Immun.* **58**, 841-845.
- Sing, A., Rost, D., Tvardovskaia, N., Roggenkamp, A., Wiedemann, A., Kirschning, C. J., Aepfelbacher, M., and Heesemann, J.** (2002). *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J.Exp.Med.* **196**, 1017-1024.
- Škoberne, M. and Geginat, G.** (2002). Efficient in vivo presentation of *Listeria monocytogenes*- derived CD4 and CD8 T cell epitopes in the absence of IFN-gamma. *J.Immunol.* **168**, 1854-1860.
- Škoberne, M., Schenk, S., Hof, H., and Geginat, G.** (2002). Cross-presentation of *Listeria monocytogenes*-derived CD4 T cell epitopes. *J.Immunol.* **169**, 1410-1418.
- Sory, M. P. and Cornelis, G.** (1988). *Yersinia enterocolitica* O:9 as a potential live oral carrier for protective antigens. *Microb.Pathog.* **4**, 431-442.
- Sory, M. P. and Cornelis, G. R.** (1990). Delivery of the cholera toxin B subunit by using a recombinant *Yersinia enterocolitica* strain as a live oral carrier. *Res.Microbiol.* **141**, 921-929.
- Sory, M. P., Kaniga, K., Goldenberg, S., and Cornelis, G. R.** (1992). Expression of the eukaryotic *Trypanosoma cruzi* CRA gene in *Yersinia enterocolitica* and induction of an immune response against CRA in mice. *Infect.Immun.* **60**, 3830-3836.
- Sory, M. P. and Cornelis, G. R.** (1994). Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol.Microbiol.* **14**, 583-594.
- Sory, M. P., Boland, A., Lambermont, I., and Cornelis, G. R.** (1995). Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 11998-12002.
- Staats, H. F., Jackson, R. J., Marinaro, M., Takahashi, I., Kiyono, H., and McGhee, J. R.** (1994). Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr.Opin.Immunol.* **6**, 572-583.
- Starnbach, M. N. and Bevan, M. J.** (1994). Cells infected with *Yersinia* present an epitope to class I MHC-restricted CTL. *J.Immunol.* **153**, 1603-1612.

Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melian, A., Bogdan, C., Porcelli, S. A., Bloom, B. R., Krensky, A. M., and Modlin, R. L. (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282**, 121-125.

Stojiljkovic, I. and Hantke, K. (1992). Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *EMBO J.* **11**, 4359-4367.

Stojiljkovic, I. and Hantke, K. (1994). Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol.Microbiol.* **13**, 719-732.

Tamm, A., Tarkkanen, A. M., Korhonen, T. K., Kuusela, P., Toivanen, P., and Skurnik, M. (1993). Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol.Microbiol.* **10**, 995-1011.

Tauxe, R. V., Vandepitte, J., Wauters, G., Martin, S. M., Goossens, V., De Mol, P., Van Noyen, R., and Thiers, G. (1987). *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* **1**, 1129-1132.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 4350-4354.

Trulzsch, K., Roggenkamp, A., Pelludat, C., Rakin, A., Jacobi, C., and Heesemann, J. (2001). Cloning and characterization of the gene encoding periplasmic 2',3'-cyclic phosphodiesterase of *Yersinia enterocolitica* O:8. *Microbiology* **147**, 203-213.

Trulzsch, K., Roggenkamp, A., Aepfelbacher, M., Wilharm, G., Ruckdeschel, K., and Heesemann, J. (2003). Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica*. *Int.J.Med.Microbiol.* **293**, 167-177.

Une, T. and Brubaker, R. R. (1984). In vivo comparison of avirulent Vwa- and Pgm- or Pstr phenotypes of yersiniae. *Infect.Immun.* **43**, 895-900.

Van Damme, M., Sory, M. P., Biot, T., Vaerman, J. P., and Cornelis, G. R. (1992). Oral immunization against cholera toxin with a live *Yersinia enterocolitica* carrier in mice. *Gastroenterology* **103**, 520-531.

Verma, N. K., Ziegler, H. K., Wilson, M., Khan, M., Safley, S., Stocker, B. A., and Schoolnik, G. K. (1995). Delivery of class I and class II MHC-restricted T-cell epitopes of listeriolysin of *Listeria monocytogenes* by attenuated *Salmonella*. *Vaccine* **13**, 142-150.

Vogel, U., Autenrieth, I. B., Berner, R., and Heesemann, J. (1993). Role of plasmid-encoded antigens of *Yersinia enterocolitica* in humoral immunity against secondary *Y. enterocolitica* infection in mice. *Microb.Pathog.* **15**, 23-36.

Wauters, G., Kandolo, K., and Janssens, M. (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib.Microbiol.Immunol.* **9**, 14-21.

- Yang, Y. and Isberg, R. R.** (1993). Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis* yadA product. *Infect.Immun.* **61**, 3907-3913.
- Yao, T., Meccas, J., Healy, J. I., Falkow, S., and Chien, Y.** (1999). Suppression of T and B lymphocyte activation by a *Yersinia pseudotuberculosis* virulence factor, yopH. *J.Exp.Med.* **190**, 1343-1350.
- Yrlid, U., Svensson, M., Kirby, A., and Wick, M. J.** (2001). Antigen-presenting cells and anti-Salmonella immunity. *Microbes.Infect.* **3**, 1239-1248.
- Zumbihl, R., Aepfelbacher, M., Andor, A., Jacobi, C. A., Ruckdeschel, K., Rouot, B., and Heesemann, J.** (1999). The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J.Biol.Chem.* **274**, 29289-29293.

Publikationsliste

Trülsch, K., Sporleder, T., Igwe, E. I., Rüssmann, H. and Heesemann, J. (2004).
Contribution of the Major Secreted Yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to Pathogenicity in the Mouse Infection Model. *Infect.Immun.* **72**, 5227-5234.

Trülsch, K., Geginat, G., Sporleder, T., Ruckdeschel, K., Hoffmann, R., Heesemann, J., and Rüssmann, H. (2005)
Yersinia Outer Protein P (YopP) Inhibits CD8 T-Cell Priming in the Mouse Infection Model
J. Immunol. **174**, 4244-4251.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Thorsten Sporleder
geboren am 06. 07. 1972
in Siegburg

Studium und berufliche Praxis

- 04/2001 - 07/2004 Promotion am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians Universität München, Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft und Mitglied des Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“
Lehrstuhl Bakteriologie, Prof. Dr. Dr. J. Heesemann
- 08/2000 - 02/2001 Festanstellung als Apotheker in der Washington Apotheke Hamburg
- 07/2000 Apothekervertretung in der Apotheke am Jungfernstieg Hamburg
- 06/2000 Approbation als Apotheker
- 05/1999 - 05/2000 Pharmaziepraktikum in der privilegierten Adler-Apotheke Hamburg
- 10/1994 - 04/1999 Studium der Pharmazie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- 1993 - 1994 Ableistung des Grundwehrdienstes bei der Marine Wilhelmshaven

Praktika und Tätigkeiten neben dem Studium

- 07/2003 Rhetorikseminar „Profil“ am Institut für Psycholinguistik der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 11/1996 - 10/1998 Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für pharmazeutische Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- 02-03/1998 Praktikum an der *Universidad Nacional Autonoma de Mexico* im *Instituto de Quimica Mexico City*
- 08/1995 Zusätzliche Famulatur bei der Desitin Arzneimittel GmbH Hamburg

Schulische Ausbildung

- 1979-1993 Besuch der Grundschule Klein Berkel, Orientierungsstufe West Hameln und des Schiller-Gymnasiums Hameln
- Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

Die vorliegende Doktorarbeit wurde am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann erstellt.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung und die Betreuung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. Konrad Trülzsch für die Betreuung und die Durchsicht des Manuskripts. Frau Laryssa Teplytska für die technische Unterstützung im Labor.

Herrn P.D. Dr. H. Rüssmann für die Bereitstellung der Plasmide und die freundliche Unterstützung bei Problemen und Fragen sowie Herrn Dr. G. Geginat für die Kooperation bei dem Antigenpräsentationsassay.

Christina Kraus, Gottfried Wilharm und Klaus Panthel für die Hilfsbereitschaft und die Beantwortung zahlreicher Fragen.

Den Doktoranden Beatrix, Dagmar, Katrin, Moni, Natasha und Victoria für ihre Hilfsbereitschaft, gegenseitige Unterstützung und das gute Arbeitsklima.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Stephanie Vieth für ihr Verständnis und die Korrektur der Arbeit und meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht, mich unterstützt und motiviert haben.