

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

Lehrstuhl: Bakteriologie

Vorstand: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann

**Einfluss der Kolonisierungskinetik rekombinanter Salmonellen
auf die Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen
im oralen Maus-Immunisierungsmodell**

Dissertation

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

vorgelegt von

Justin Hermann Hetrodt

aus

Coesfeld

Jahr

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Holger Rüssmann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Karl-Heinz Herbinger
Priv. Doz. Dr. Sabine Hofmann-Thiel

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2013

Meinen Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abkürzungen	IV
1.	Einleitung.....	1
1.1.	Impfungen	1
1.1.1.	Aktive und passive Impfung	1
1.1.2.	Korrelat des Schutzes	1
1.1.3.	T-Zellen.....	2
1.2.	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium.....	3
1.2.1.	Pathogenese.....	3
1.2.2.	<i>S. typhimurium</i> als Vakzin-Vektor	6
1.2.3.	<i>L. monocytogenes</i> als Modellerreger	8
1.2.4.	Die orale Immunisierungsrute	9
1.3.	Ziel der Arbeit.....	11
2.	Material und Methoden.....	13
2.1.	Geräte.....	13
2.2.	Verbrauchsmaterialien.....	14
2.3.	Chemikalien und Biochemikalien	14
2.4.	Puffer und Nährmedien	15
2.5.	Bakterien und Plasmide	15
2.5.1.	<i>S. typhimurium</i> SB824 (pHR241)	15
2.5.2.	<i>L. monocytogenes</i>	15
2.6.	Antikörper	16

2.7.	Antibiotika	16
2.8.	Tetramere.....	16
2.9.	Molekularbiologische Methoden	17
2.9.1.	Kultivierung von <i>S. typhimurium</i>	17
2.9.2.	Sensitivität von SB824 gegenüber Ciprofloxacin	17
2.9.3.	Kultivierung von <i>L. monocytogenes</i>	18
2.10.	Tierexperimentelle Versuche	18
2.10.1.	Orale Immunisierung von Mäusen mit Salmonellen	18
2.10.2.	Applikation von Ciprofloxacin	18
2.10.3.	Organentnahme	19
2.10.4.	<i>Salmonella</i> -Kolonisierungsstudien	19
2.10.5.	Belastungsinfektionen mit Listerien.....	20
2.11.	Immunologische Methoden	20
2.11.1.	Durchflusszytometrie	20
2.11.2.	Aufbereitung der Splenozyten für die Tetramerfärbungen.....	21
2.11.3.	Färbung der Splenozyten	22
2.12.	Statistische Tests und Auswertung	23
3.	Ergebnisse	24
3.1.	Immunisierung mit <i>S. typhimurium</i>	24
3.1.1.	Induktion p60 ₂₁₇₋₂₂₅ -spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	24
3.1.2.	Kinetik der p60 ₂₁₇₋₂₂₅ -spezifischen CD8 ⁺ T-Zell-Antwort	27
3.2.	Beeinflussung der Kolonisierungskinetik durch Ciprofloxacin.....	29
3.2.1.	Wirksamkeit von Ciprofloxacin <i>in vitro</i>	29
3.2.2.	Applikationswege von Ciprofloxacin	30
3.2.3.	Wirksamkeit von Ciprofloxacin im Mausmodell	32

3.3.	Einfluss der Antibiotikagabe auf die p60 ₂₁₇₋₂₂₅ -spezifische CD8 ⁺ T-Zell-Frequenz ...	35
3.4.	Einfluss der Antibiotikagabe auf die Funktionalität der p60 ₂₁₇₋₂₂₇ -spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	37
3.4.1.	Methoden zur Analyse der T-Zell-Qualität.....	37
3.4.2.	T-Zell-Subpopulationen.....	38
3.4.3.	Belastungsinfektionen mit <i>L. monocytogenes</i>	40
4.	Diskussion.....	44
4.1.	<i>Salmonella</i> -Impfvektoren.....	44
4.2.	Einfluss der Kolonisierungskinetik auf die Induktion antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	47
4.2.1.	Vektorreduktion durch Ciprofloxacin.....	47
4.2.2.	Alternative Methoden zur Vektorreduktion	48
4.2.3.	Einfluss der Vektorreduktion auf die Induktion p60 ₂₁₇₋₂₂₅ -spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	49
5.	Zusammenfassung.....	55
6.	Summary	57
7.	Literaturverzeichnis.....	59
8.	Danksagung	71

II. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ActA	"Actin nucleator A"
APC	"antigen presenting cell", antigenpräsentierende Zelle
B	"Bone marrow", Knochenmark
BHI	"brain heart infusion"
BSA	Rinderserumalbumin
CD	"cluster of differentiation", Oberflächenmarker
CFU	"colony forming units" Koloniebildende Einheiten
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTL	"cytotoxic T lymphocyte", Zytotoxischer T-Lymphozyt
DC	"dendritic cell", Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	Ethidiumbromid Monoazid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	"fluorescent activated cell sorter", Durchflusszytometer
FAE	follikel-assoziiertes Epithel
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
FSC	"forward light scatter", Vorwärtsstreuung

FSC-A	„Forward scatter area“
FSC-H	„Forward scatter height“
g	Gramm
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O _{dest}	Destilliertes Wasser
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
InvG	Protein InvG
IVNP	Influenza-Virus Nukleoprotein
l	Liter
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LB	Luria Bertani
LCMVNP	Lymphozytäres-Choriomeningitis-Virus Nukleoprotein
LLO	"Listeriolysin O"
MBC	Minimale bakterizide Konzentration
MDRTF	"multi drug resistant <i>typhoid fever</i> ", durch multiresistente <i>S. typhi</i> verursachter <i>Typhus abdominalis</i>
mg	Milligramm
MHC	"major histocompatibility complex", Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
MLN	"mesenteric lymph node", mesenterialer Lymphknoten
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer

NTS	nicht-typhoide Salmonellen
PBS	"phosphate buffered saline", phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Perinidin Chlorophyll Protein
PP	Peyersche Plaques
PrgH	Protein PrgH
PrgI	Protein PrgI
PrgK	Protein PrgK
rpm	"rounds per minute", Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sog.	sogenannt
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium
SCV	" <i>Salmonella</i> containing vacuole"
SED	sub-epithelialer Dom
SILT	"solitary intestinal lymphoid tissue", solitäres intestinales lymphatisches Gewebe
SopE2	" <i>Salmonella</i> outer protein E2"
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel
SptP	<i>Salmonella</i> proteine tyrosine phosphatase
SSC	"side scatter" Seitwärtsstreuung
T	Thymus
T3SS	Typ III Sekretionssystem

TAP	Transporter assoziiert mit Antigenprozessierung
T _{CMC}	"central memory T cells", Zentrale Gedächtniszellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _{EC}	"effector T cells", Effektor-T-Zellen
T _{EMC}	"effector memory T cells", Effektor-Gedächtniszellen
UV	Ultraviolettstrahlung
YopE	" <i>Yersinia</i> outer protein E"
β2m	β2-Mikroglobulin Einschlusskörperchen

1. Einleitung

1.1. Impfungen

1.1.1. Aktive und passive Impfung

Impfungen dienen der Prophylaxe von Infektionskrankheiten. Des Weiteren werden Impfstoffe auch zur Vorbeugung nicht-infektiöser Krankheiten und zu therapeutischen Zwecken eingesetzt [2]. Es wird zwischen aktiver und passiver Impfung unterschieden. Eine aktive Impfung regt die Zellen des adaptiven Immunsystems zur Bildung schützender Antikörper oder spezifischer Abwehrzellen an. Die Gedächtniszellen des Immunsystems gewährleisten einen lang anhaltenden Schutz vor der Erkrankung [2-5]. Eine passive Impfung erfolgt durch die Verabreichung eines Antiserums oder aufgereinigter Antikörper. Diese neutralisieren Krankheitserreger oder binden an menschliche zelluläre Antigene. Passive Impfungen werden vor oder während der Exposition gegenüber einer Infektionskrankheit eingesetzt, sofern die Zeitspanne für eine aktive Impfung zu kurz ist oder kein aktiver Impfstoff zur Verfügung steht. Der Schutz oder die therapeutische Wirkung einer passiven Impfung besteht, solange die übertragenen Antikörper im Körper des Empfängers aktiv sind [2, 6].

1.1.2. Korrelat des Schutzes

Die aktive Immunisierung setzt Mechanismen des adaptiven Immunsystems in Gang, die den natürlichen Reaktionen auf einen Krankheitserreger oder dessen Proteinen während einer Infektion gleichen: Aktivierung, Differenzierung und Vermehrung von Lymphozyten [7, 8]. Die wesentlichen Mechanismen des Schutzes werden durch Antikörper, $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen ausgeübt.

Die Mehrzahl der verfügbaren Impfstoffe wirkt durch die Induktion schützender Antikörper. Sie werden durch B-Zellen produziert und wirken durch folgende Mechanismen: die Bindung und Neutralisierung von Toxinen und Viren, die Unterstützung der Phagozytose extrazellulärer Bakterien durch Opsonierung und durch die Aktivierung der Komplementkaskade [2, 9, 10].

Ein charakteristisches Merkmal von Krankheiten wie HIV, Malaria oder Tuberkulose ist die intrazelluläre Vermehrung der Erreger. Eine wirksame Schutzimpfung gegen diese Krankheiten sollte daher eine Immunität herbeiführen, die durch T-Zellen

vermittelt wird [11-13]. Gleiches gilt für die Entwicklung neuer Impfstoffe und therapeutischer Ansätze gegen Krebserkrankungen. Im Folgenden werden daher zunächst die Merkmale der zellulären Abwehr des Immunsystems beschrieben und darauffolgend Methoden zur Induktion von T-Zell-Immunität aufgeführt.

1.1.3. T-Zellen

Die Abwehr intrazellulärer Erreger oder entarteter körpereigener Zellen erfolgt durch T-Lymphozyten. Das Erkennungsinstrument der T-Zellen ist der T-Zell-Rezeptor (TCR). Jede T-Zelle ist aufgrund ihres T-Zell-Rezeptors für ein bestimmtes Antigen spezifisch. Ein Repertoire von etwa 10^{15} verschiedenen T-Zell-Rezeptoren garantiert, dass jedes beliebige Antigen erkannt werden kann [14]. T-Lymphozyten erkennen keine freien Antigene, sondern an MHC-Komplexe gebundene Peptidfragmente, die auf der Oberfläche von körpereigenen Zellen präsentiert werden. An der Immunantwort auf eine Impfung sind $CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen beteiligt. Welcher dieser beiden Zelltypen induziert wird, hängt von der Art der Aufnahme und Verarbeitung des Antigens durch die antigenpräsentierende Zelle (APC) ab. Professionelle APCs sind B-Lymphozyten, Makrophagen und insbesondere Dendritische Zellen (DCs) [15-17]. Wie im Folgenden detailliert beschrieben wird, können APCs die Antigene über den MHC Klasse II- oder MHC Klasse I-Antigenpräsentationsweg verarbeiten.

Exogene Proteine, die durch Phagozytose, Makropinozytose oder Endozytose aufgenommen wurden, werden auf dem MHC Klasse II-Antigenpräsentationsweg verarbeitet [15]. Die Proteine befinden sich nach der Aufnahme im endosomalen Kompartiment der Zelle. Hier werden die Proteine bei niedrigem pH-Wert durch Proteolyse zu kleinen Peptidfragmenten mit einer Größe von 10 bis 30 Aminosäuren degradiert [18, 19]. MHC Klasse II-Komplexe werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Mithilfe spezieller Transportmoleküle wie dem Chaperon Ii gelangen die MHC Klasse II-Komplexe zu den Endosomen. Dort findet die Beladung der MHC Klasse II-Komplexe mit den Peptidfragmenten statt [20, 21]. Der Verbund aus MHC Klasse II-Molekül und dem Antigen-Peptid wird in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert und dort an $CD4^+$ T-Zellen präsentiert [19]. Diese werden auch als $CD4^+$ T-Helferzellen bezeichnet. Sie spielen eine komplexe Rolle in der Regulation der Zellen des angeborenen Immunsystems sowie der Regulation von B-Zellen und CTLs [17]. Mit wenigen Ausnahmen induzieren alle Impfstoffe $CD4^+$ T-Zellen [22].

Proteine, die aus dem Zytosol der Zelle stammen, werden über den MHC Klasse I-Antigenpräsentationsweg verarbeitet [23]. Bei diesen Proteinen handelt es sich um körpereigene Proteine, um Proteine entarteter Körperzellen oder um Proteine von Krankheitserregern, die sich im Zytosol der Zelle vermehren [24]. Die zytosolischen Proteine werden von einem multikatalytischen Komplex, dem Proteasom, degradiert und in das Lumen des ER transportiert. Den Transport gewährleisten die Proteine TAP 1 und TAP 2 (Transporter assoziiert mit Antigenprozessierung) [24, 25]. Im ER findet eine weitere Verkleinerung der Peptidfragmente durch Aminopeptidasen statt. Die Peptidfragmente haben danach eine Länge von 8 bis 12 Aminosäuren. Sie werden an einen MHC Klasse I-Komplex gebunden und gemeinsam mit diesem an der Zelloberfläche präsentiert [19, 26]. Die Fähigkeit zur MHC Klasse I-Präsentation besitzen alle kernhaltigen Körperzellen. Zur Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen durch MHC Klasse I-Präsentation sind insbesondere die DCs fähig [27]. CD8⁺ T-Zellen werden auch T-Killerzellen oder zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) genannt. Sie sind in der Lage, infizierte oder anderweitig beschädigte Zellen zu erkennen und deren Tod herbeizuführen [28]. Um durch einen Impfstoff antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen induzieren zu können, muss das Antigen in das Zytosol der APCs dirigiert werden. Unter den zugelassenen Impfstoffen sind hierzu die abgeschwächten Lebendimpfstoffe fähig [2]. In experimentellen Ansätzen kann T-Zell-Immunität außerdem durch DNA-Impfstoffe, Prime-Boost-Impfstoffe und durch rekombinante lebende Impfstoffträger, sog. Vektoren, herbeigeführt werden [29]. Im Rahmen dieser Arbeit werden Salmonellen als Vektoren zur Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen vorgestellt.

1.2. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

1.2.1. Pathogenese

Ein intensiv beforschter Impfvektor für orale Immunisierungen ist *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) [30, 31]. *S. typhimurium* ist ein gramnegatives, fakultativ intrazellulär lebendes Stäbchenbakterium. Bei immunkompetenten Menschen verursacht es eine spontan ausheilende Gastroenteritis und gehört daher der Gruppe der nicht-typhoiden Salmonellen (NTS) an [32]. Zu den typhoiden Salmonellen zählen *Salmonella typhi* (*S. typhi*) und *Salmonella paratyphi*. Sie verursachen die systemische Erkrankung *Typhus abdominalis* (auch *typhoides Fieber* oder *enterisches Fieber* genannt) [33]. Einziger Wirt von *S. typhi* ist der Mensch.

Da *S. typhimurium* in Mäusen ein typhusähnliches Krankheitsbild mit systemischer Infektion hervorruft, dient es als Modell zur Ergründung der Pathomechanismen des *Typhus abdominalis* [32, 34-36].

Die Infektion mit *Salmonella* erfolgt oral. Die Salmonellen dringen im distalen Ileum oder Kolon über verschiedene Wege in die intestinale Schleimhaut ein, um sich von dort systemisch auszubreiten. Als wichtige Eintrittspforten gelten villöse oder in Peyerschen Plaques (PP) lokalisierte M-Zellen und phagozytierende Zellen wie Makrophagen oder DCs [37]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der induzierten Aufnahme durch üblicherweise nicht phagozytierende Enterozyten oder die parazelluläre Überwindung der intestinalen Schleimhaut [38-43].

Wichtig für die Invasion sind verschiedene Virulenzfaktoren. Diese sind im Genom von *S. typhimurium* auf sog. Pathogenitätsinseln kodiert. Die *Salmonella* Pathogenitätsinseln 1 und 2 (SPI 1 und SPI 2) enthalten die genetische Information zur Ausbildung von Typ III Sekretionssystemen (T3SS). Diese dienen dem Transport von Salmonellen-Proteinen in die Wirtszellen. Die Salmonellen-Proteine können darauffolgend die Wirtszellen zugunsten des Bakteriums manipulieren [44]. Bei *in vitro* Experimenten lassen sich zwei verschiedene Arten des Transportes über das T3SS beobachten: Sekretion und Translokation [45]. Sekretion bezeichnet den Transport der Effektorproteine in das Medium, das die Bakterien umgibt. Translokation bezeichnet die Beförderung von Effektorproteinen in das Zytosol der Wirtszellen [45]. Bei der Translokation funktioniert das T3SS wie eine molekulare Nadel, mit deren Hilfe die Effektorproteine durch die Zellmembran der Wirtszelle in dessen Zytosol injiziert werden [46, 47]. Die besondere Bedeutung der T3SS für die Entwicklung von Impfstoffen wird im weiteren Verlauf noch genauer beschrieben. Einen Überblick des Aufbaus der T3SS gibt Abb. 1.

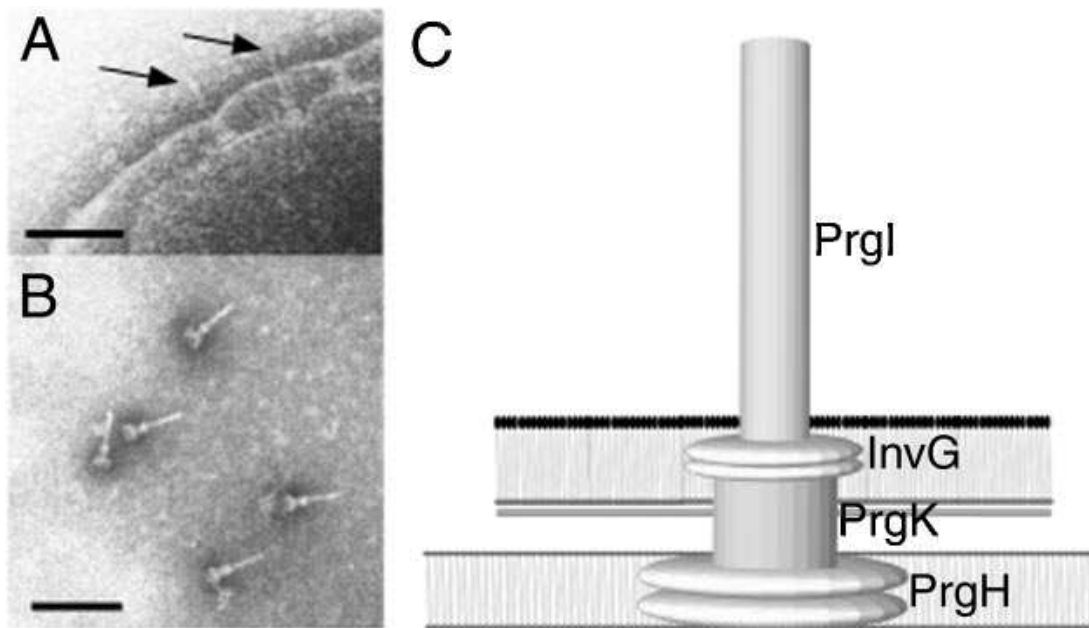


Abbildung 1 Nadelkomplex des *Salmonella* Typ III Sekretionssystems. A zeigt den Nadelkomplex auf der Hülle osmotisch geschockter Salmonellen. B zeigt elektronenmikroskopische Bilder aufgereinigter Nadelkomplexe. C zeigt ein Schema des T3SS: die Proteine PrgH, PrgK und InvG bilden die Basis, PrgI formt die Nadelstruktur [1].

Die Effektorproteine der SPI 1 bewirken strukturelle Veränderungen der Zellmembran und hierdurch die gezielte Aufnahme *Salmonellas* in die Wirtszelle [48]. Wichtige SPI 1-Effektoren sind das „*Salmonella* outer protein E2“ (SopE2) oder die „*Salmonella* proteine tyrosine phosphatase“ (SptP). SopE2 kann in der Wirtszelle das sog. „membrane ruffling“ auslösen, wodurch die Salmonelle über Makropinozytose in die eukaryontische Zelle eindringen kann [49-51]. SptP ist ein GTPase-aktivierendes Protein und induziert durch die Hemmung von G-Proteinen die Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes des Zytoskeletts der Wirtszelle [51, 52]. Um nach der Aufnahme das intrazelluläre Überleben von *Salmonella* zu sichern und um eine Phago-Lysosomenfusion zu verhindern, wird ein spezielles Kompartiment ausgebildet. Dieses wird durch die Effektorproteine der SPI 2 geschaffen und als „*Salmonella* containing vacuole“ (SCV) bezeichnet. Ein wichtiger Vertreter der SPI 2 Effektoren ist SspH2 [1].

1.2.2. *S. typhimurium* als Vakzin-Vektor

Abgeschwächte Lebendimpfstoffe erzeugen komplexe mukosale und systemische Immunantworten. Lebendimpfstoffe können insbesondere auch die zelluläre Abwehr und somit antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellen aktivieren und finden als Träger für heterologe Antigene vielfältige Anwendung in der Impfstoffentwicklung. *S. typhimurium* wird in Tierversuchen als effektiver Impfstoff-Vektor eingesetzt. Ein besonderer Vorteil *Salmonellas* ist die Fähigkeit zur Besiedelung sowohl der intestinalen Schleimhaut als auch systemischer Organe.

Beim Einsatz von *S. typhimurium* als Vakzin-Vektor ist jedoch die Induktion der $CD8^+$ T-Zell-Immunität eingeschränkt. Wie oben dargestellt verweilt *Salmonella* während der intrazellulären Replikationsphase in der SCV. Von einem *Salmonella*-Impfvektor sekretierte heterologe Antigene werden daher bevorzugt über den MHC Klasse II-Pfad nach dem Muster eines extrazellulär aufgenommenen Antigens prozessiert, siehe hierzu auch Abbildung 2. Über den MHC Klasse II-Präsentationsweg präsentierte Antigene aktivieren $CD4^+$ T-Zellen, nicht jedoch die zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen.

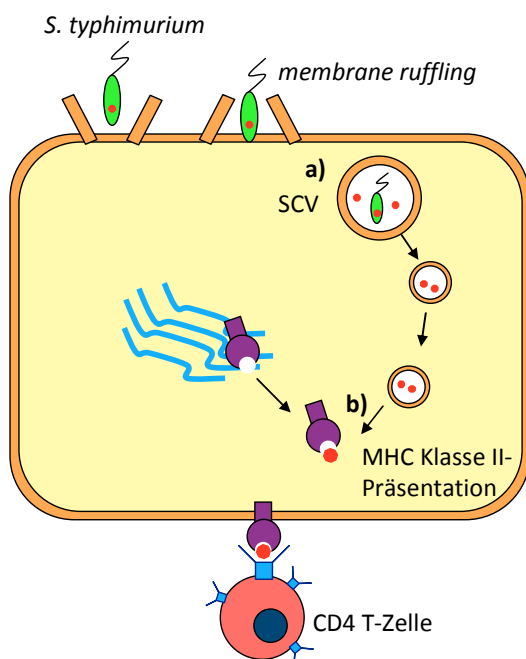


Abbildung 2 MHC Klasse II-Antigenpräsentation. Salmonellen-Proteine werden in die SCV sekretiert (siehe a). Aufgrund der Lokalisation in einem membrangebundenen Kompartiment werden die Proteine über den MHC Klasse II-Präsentationsweg verarbeitet (siehe b). Somit werden $CD4^+$ T-Zellen induziert.

Rüssmann und Kollegen entwickelten eine Strategie, um dieses Problem zu umgehen. Das *Salmonella*-T3SS wurde ausgenutzt, um antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen zu induzieren. Hierzu wurden Mäuse oral mit rekombinanten, abgeschwächten *S. typhimurium* immunisiert. Diese trugen ein immunogenes Nukleoprotein des lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMVNP₁₁₈₋₁₂₆) oder des Influenza-Virus (IVNP₃₆₆₋₃₇₄), gekoppelt an das bereits oben beschriebene T3SS-Effektorprotein SptP [53]. Das Fragment des Virus-Proteins wurde gemeinsam mit SptP über das *Salmonella*-T3SS in das Zytosol der Wirtszelle befördert. Aufgrund der so erreichten intrazellulären Lokalisation dieses Proteins wurde es über den MHC Klasse I-Präsentationsweg verarbeitet. Durch die MHC Klasse I-Antigenpräsentation konnten antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen induziert werden [53]. Diese waren in der Lage, vor einer Infektion mit dem Choriomeningitis- oder dem Influenza-Virus zu schützen. Diese Methode erlaubte die Translokation, also das zytosolische Deponieren, von kleinen heterologen Antigenen.

In weiteren Studien wurde nach größeren Trägerproteinen für heterologe Antigene gesucht. Das „*Yersinia* outer protein E“ (YopE) ist ein T3SS-Effektorprotein des Bakteriums *Yersinia enterocolitica* [54]. Da bekannt war, dass YopE über das T3SS von *S. typhimurium* transportiert werden kann, wurde das immunogene Protein p60₁₃₀₋₄₇₇ von *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) an YopE gekoppelt und anschließend das Fusionsprotein YopE₁₋₁₃₈/p60₁₃₀₋₄₇₇ in das Genom von *S. typhimurium* Stamm SB824 eingefügt [55]. SB824 ist ein virulenzabgeschwächter *S. typhimurium*-Stamm [56]. Durch das Einfügen des YopE₁₋₁₃₈/p60₁₃₀₋₄₇₇ Fusionsproteins in SB824 entstand SB824 (pHR241) [57]. Dieser Stamm wurde bei allen Salmonellen-Immunisierungsversuchen im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Die Salmonellen translozierten nach oraler Immunisierung von Mäusen das YopE₁₋₁₃₈/p60₁₃₀₋₄₇₇ Fusionsprotein über das T3SS in das Zytosol der Wirtszellen. Hierdurch wurden p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert. Diese vermittelten Schutz vor einer üblicherweise tödlichen Dosis *L. monocytogenes* [57]. Siehe hierzu auch Abb. 3.

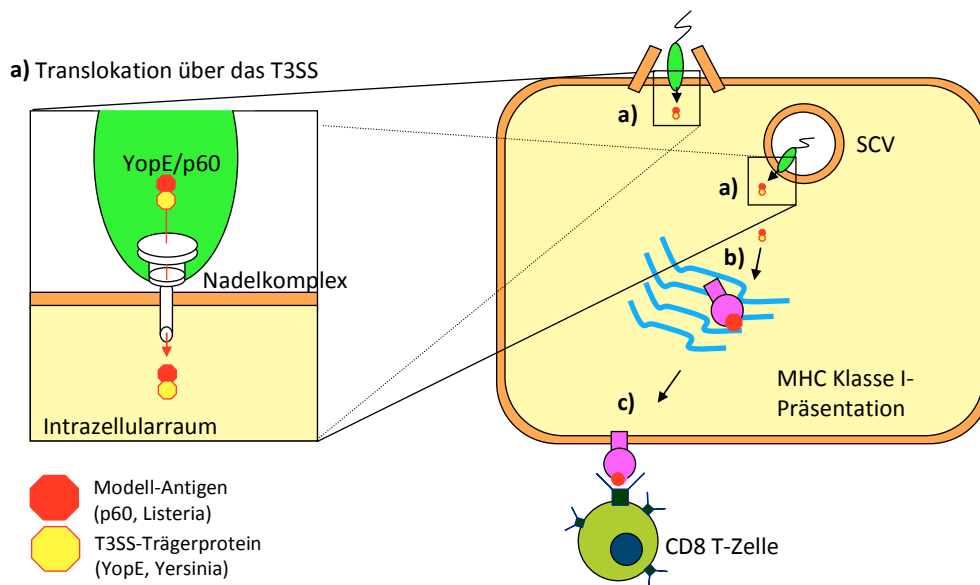


Abbildung 3 Translokation über das *Salmonella* T3SS. Das YopE/p60 Fusionsprotein wird über das T3SS in das Zytosol der APC transportiert (siehe a und Vergrößerung). Durch die Prozessierung über den MHC Klasse I-Präsentationsweg werden p60-spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert (siehe b und c).

1.2.3. *L. monocytogenes* als Modellerreger

Das Bakterium *L. monocytogenes* wird über kontaminierte Lebensmittel übertragen und verursacht bei immunkompetenten Menschen eine selbstlimitierende Gastroenteritis. Bei immungeschwächten oder schwangeren Patienten können jedoch schwere Verlaufsformen mit systemischer Erregerausbreitung, Meningitis, Enzephalitis oder Aborten auftreten [58]. Das grampositive Bakterium vermehrt sich im Zytosol infizierter Zellen und kann sich von Zelle zu Zelle ausbreiten [59]. Nach dem Eindringen in die Zelle befindet sich *Listeria* in einer membrangebundenen Vakuole. Mithilfe des Zytolysins „Listeriolysin O“ (LLO) können Listerien diese Vakuole auflösen und gelangen in das Zytosol der Zelle [60]. Sobald *Listeria* in das Zytosol der Zelle gelangt ist, beginnt die Produktion des Proteins „Actin nucleator A“ (ActA). Dieses polymerisiert das Aktin der Wirtszelle und befähigt *Listeria*, sich direkt von Zelle zu Zelle zu verbreiten [61]. Somit kann *Listeria* sich ausbreiten, ohne extrazellulären Abwehrmechanismen ausgesetzt zu sein [62]. Ein weiterer Virulenzfaktor von *L. monocytogenes* ist das im Rahmen dieser Arbeit als Modellantigen verwendete p60-Protein. Diese Mureinhydrolase ist an Zellkontakten beteiligt und remodelliert die Peptidoglykanschicht von *Listeria* während der Zellteilung [63-65].

Aufgrund der intrazellulären Vermehrung der Listerien werden Listerien-Proteine wie LLO oder p60 über den MHC Klasse I-Präsentationsweg verarbeitet. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen sind daher wesentlich an der Immunantwort auf Listerien-Infektionen beteiligt. Studien im Mausmodell ergaben, dass nach intravenöser Listerien-Infektion hauptsächlich LLO- und p60-spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert werden [66, 67]. Harty und Pamer konnten nachweisen, dass p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen adoptiv übertragbaren Schutz vor einer Listerien-Infektion vermitteln [68]. Diese Ausführungen erklären die besondere Eignung des p60-Proteins als Modellantigen für Studien über zytosolisch deponierte Antigene.

1.2.4. Die orale Immunisierungsroute

Impfstoffe werden überwiegend intramuskulär oder subkutan injiziert [69]. Im Muskelgewebe befinden sich eine Vielzahl von DCs, Neutrophilen und Monozyten. Diese werden durch das Antigen oder Adjuvans des Impfstoffes aktiviert, phagozytieren das Antigen und wandern in die drainierenden Lymphknoten. Dort aktivieren antigenpräsentierende DCs die B- und T-Zellen [2, 69]. Injizierte Impfstoffe haben jedoch eine eingeschränkte Fähigkeit, um Immunität in den Schleimhäuten des Körpers herbeizuführen. Da geschätzte 90 % der Infektionskrankheiten durch Eindringen des Erregers über die Schleimhäute des Körpers initiiert werden [70], ist häufig eine mukosale Immunität erforderlich. Diese kann induziert werden, wenn das Impfantigen über die Schleimhäute des Körpers aufgenommen wird. So resultiert eine systemische Immunität gleichsam mit einer mukosalen Immunität. Daher werden immer mehr Impfstoffe entwickelt, die nasal oder oral appliziert werden können [71].

Die oben beschriebene *S. typhimurium*-Immunisierungsstrategie profitiert von diesem Vorteil der oralen Applikation. Die Übertragung dieses Konzeptes auf eine klinische Anwendung beinhaltet allerdings mehrere Herausforderungen. Da *S. typhimurium* der murine Modellerreger für *Typhus abdominalis* ist, sollte für humane Immunisierungen *S. typhi* verwendet werden [72]. Eine orale Impfung mit *S. typhi* auf dem natürlichen Immunisierungsweg ist jedoch mit erheblichen Risiken für den Patienten verbunden. Zu benennen sind hier die Gefahr der ungewollten systemischen Ausbreitung des Impfvektors, die Entwicklung einer übermäßig starken Immunantwort sowie die Möglichkeit der Übertragung des Lebendimpfstoffes auf Kontaktpersonen oder die Umwelt. Eine systemische Erkrankung mit der Gefahr einer Sepsis könnte bei gesunden und insbesondere auch bei immungeschwächten Patienten auftreten. Mögliche postinfektiöse Reaktionen

beinhalten Arthritis, Uveitis und Urethritis, die auch bei natürlichen Infektionen mit Salmonellen beobachtet werden [73, 74].

Mit dem Lebendimpfstoff Ty21a existiert seit den 1970er Jahren ein attenuierter (virulenzabgeschwächter) *S. typhi*-Stamm, dessen Sicherheit in vielen klinischen Studien erprobt wurde [75]. Für eine effektive Impfung gegen Typhus muss dieser Impfstamm allerdings drei- bis viermal verabreicht werden [76]. Durch Verwendung rekombinanter DNA-Technologie wurden weitere attenuierte *S. typhi* Stämme entwickelt. Hierzu gehören Ty800 [77] oder CVD908 [78], die nur einmalig verabreicht werden müssen. Es zeigte sich jedoch, dass all diese Stämme beim Transport heterologer Antigene nur schwach immunogen sind. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass optimal attenuierte Typhus-Impfstoffe für den Einsatz als Vektoren für heterologe Antigene bereits zu stark attenuiert sein könnten [72].

Eine weitere Strategie zur Optimierung der Sicherheit eines *S. typhi* Lebendimpfstoffes könnte daher in einer Verkürzung der Kolonisierungsdauer liegen. Daher sollte in der hier vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Vektorreduktion auf die Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten zeigen, wie viele Tage der Lebendimpfstoff auf seinem natürlichen Immunisierungsweg kolonisieren muss, bis eine schützende Frequenz antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen induziert wird.

1.3. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer neuartigen Impfstrategie. *S. typhimurium* diente als Träger heterologer Antigene zur Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen im oralen Maus-Immunisierungsmodell. In vorherigen Studien konnten antigenspezifische CD8⁺ T-Zell-Populationen generiert werden, die Schutz vor Viren, intrazellulären Bakterien oder Tumoren vermittelten [53, 79].

Nach oraler Immunisierung von Mäusen mit dem Stamm SB824 (pHR241) wurde das heterologe Antigen p60, ein immunogenes Protein des Bakteriums *L. monocytogenes*, über das *Salmonella*-T3SS in das Zytosol von APCs transloziert. Aufgrund der Verarbeitung des Antigens über den MHC Klasse I-Antigenpräsentationsweg wurden p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert. Diese vermittelten Schutz vor einer Belastungsinfektion mit *L. monocytogenes* [57].

Es sollte überprüft werden, wie eine quantitative Reduktion des *Salmonella*-Impfvektors zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung die Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen beeinflusst. Zunächst musste eine Methode zur Reduktion des Impfvektors etabliert werden. Analog zu klinischen Empfehlungen bei Typhus- und Paratyphus-Erkrankungen wurde das Fluorchinolon Ciprofloxacin verwendet [33, 80, 81]. Als nächster Schritt wurde der Einfluss dieser Vektorreduktion auf die Induktion p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen evaluiert. In verschiedenen Gruppen wurde an den Tagen 0, 2 oder 4 nach oraler Immunisierung eine Reduktion der Impfvaktormenge durch eine mehrtägige Ciprofloxacingabe begonnen. An Tag 11 wurde die Menge der generierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen und einer immunisierten Kontrollgruppe ohne Antibiotikagabe analysiert. Die Frequenz p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurde mithilfe der Tetramer-Technologie durchflusszytometrisch quantifiziert. Zusätzlich wurden die T-Zellen auch phänotypisch charakterisiert. Hierzu wurde die funktionelle Aufteilung der generierten T-Zell-Subpopulationen untersucht. Die Effektivität der Immunisierung wurde außerdem durch eine letale Belastungsinfektion mit *L. monocytogenes* überprüft.

Diese Untersuchungen sollten zeigen, ab welchem Zeitpunkt nach der Immunisierung mit einer Antibiotikaverabreichung begonnen werden kann, ohne die Generierung schützender CD8⁺ T-Zell-Populationen zu beeinträchtigen. Hierdurch sollte, auch im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung, ein wichtiger Beitrag zur Optimierung der Sicherheit dieser neuartigen Impfstrategie geleistet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Tab. 1 Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	Kern 440-33	Sartorius, Göttingen
Brutschrank	Typ B 20	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	Gasprofi 1 micro	WLD -TEC GmbH, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	Cytoperm 2	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	FACSCantoTMII	BD, Heidelberg
Homogenisator	MM 2000	Retsch, Wuppertal
Magnetrührer	IKA RET	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	320 pH-Meter	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Gilson	Limburg-Offheim
Pipetten	Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu-Jet Pro	Brand, Wertheim
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	Bio-Rad, München
Schlundsonden	Nicht näher bezeichnet	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Spektralphotometer	Spectronic 20	Heraeus, Hanau
Sterilwerkbank	Herasafe HS 12	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Wasserbad	WB/OB7-45	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	Eppendorf 5417C und 5810R	Sorvall, Langengelsbold
Zentrifugen	Sorvall super-21	Kendro, Hanau

Neben oben aufgelisteten Geräten wurden Labor-Standard-Geräte verwendet.

2.2. Verbrauchsmaterialien

Tab. 2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Einmalspritzen 10 ml	Braun Melsungen
FACS-Röhrchen	Beckton Dickinson, Heidelberg
Injektionsnadeln	Braun, Melsungen
Metallkugeln	NeoLab, Heidelberg
Nylonfilter 50 µm	Hartenstein, Würzburg
Petrischalen (Plastik)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter 0,22 µm u 0,45 µm	Millipore, Schwalbach
Sterilfilter Groß	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Beckton Dickenson, Heidelberg
Zellsiebe 70 µm	Beckton Dickenson, Heidelberg
96 Lochplatten, Mikrotiter Rundboden	Hartenstein, Würzburg

2.3. Chemikalien und Biochemikalien

Tab. 3 Verwendete Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalie/Biochemikalie	Hersteller
Antibiotika	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Bayer, Leverkusen
BHI	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	PAN, Aidenbach
DPBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
EMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS-Antikörper	Becton Dickinson, Heidelberg
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Agar	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Base	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tetramere	Prof. Dr. Dirk H. Busch, TU München
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe

2.4. Puffer und Nährmedien

Tab. 4 Verwendete Puffer und Nährmedien

Puffer/Nährmedium	Zusammensetzung
ACT	NH ₄ Cl 0,15 M; Tris/HCl 0,017 M, pH 7,4
BHI-Agar	33g BHI, 15g Bacto Agar ad 1L H ₂ O
BHI-Medium	33g BHI ad 1L H ₂ O
FACS-Puffer	1L PBS, 5g BSA
LB-Agar	15g Bacto Agar, 10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 5g NaCl ad 1L H ₂ O
LB-Medium	10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 5g NaCl ad 1L H ₂ O
LB NaCl 0,3M	10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 17,53g NaCl ad 1L H ₂ O
PBS	8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na ₂ HPO ₄ , 0,24g KH ₂ PO ₄ ad 1L H ₂ O
Trypanblau-Lösung	0,05g Trypanblau ad 10 ml PBS
T-Zell-Medium	RPMI, 10 %(V/V) FCS, 1 %(V/V) Penicillin (10000 U/ml), 1 %(V/V) Streptomycin (10 mg/ml), 0,1 %(V/V) Ciprofloxacin (10 mg/ml)

2.5. Bakterien und Plasmide

2.5.1. *S. typhimurium* SB824 (pHR241)

S. typhimurium SB824 [53] enthält das sptP::kan Allel aus Stamm SB237 [82], eingeführt in den Δ aroA Stamm SL3261 [56]. Für orale Immunisierungen wurde SB824 (pHR241) eingesetzt. Der Ursprungsvektor des Plasmides pHR241 ist pWSK29. Das Plasmid trägt die genetische Information, um chimäres YopE₁₋₁₃₈/p60₁₃₀₋₄₇₇/M45 unter Expressionskontrolle des *lac* Promotors zu translozieren. Dieser ist konstitutiv aktiv in *Salmonella*. Durch Elektroporation wurde pHR241 in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stamm SB824 transformiert [57].

2.5.2. *L. monocytogenes*

Für die Schutzversuche mit *L. monocytogenes* wurde der Wildtyp-Stamm 10403s verwendet [83].

2.6. Antikörper

Tab. 5 Für FACS-Färbungen eingesetzte Antikörper

Spezifität (gegen Maus)	Klon	Format	Hersteller
CD4	RM4-5	PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8a	53-6.7	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8a	53-6.7	APC eFluor 780	NatuTec, Frankfurt am Main
CD8a	53-6.7	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
CD8a	53-6.7	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD62L	MEL-14	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 127	A7R34	APC	NatuTec, Frankfurt am Main

2.7. Antibiotika

Tab. 6 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stock-Konzentration	End-Konzentration
Ampicillin	10 mg/ml in H ₂ O _{dest}	100 µg/ml
Ciprofloxacin	10 mg/ml in H ₂ O _{dest}	2 mg/ml und 10 mg/ml
Kanamycin	5 mg/ml in H ₂ O _{dest}	50 µg/ml
Penicillin	-	10000 U/ml
Streptomycin	8 mg/ml in H ₂ O _{dest}	50 µg/ml

2.8. Tetramere

Die Spezifität von CD8⁺ T-Zellen wird durch den TCR vermittelt. Dessen natürlicher Ligand ist der MHC Klasse I-Komplex [84]. Um die p60-spezifischen CD8⁺ T-Zellen *ex vivo* zu identifizieren, wurden MHC Klasse I-Tetramere verwendet, welche freundlicherweise im Labor von Prof. Dr. Dirk Busch, München, hergestellt wurden. Hierzu wurde ein rekombinantes H2-K^d Epitop, welches eine Biotinylierungsseite trägt, in *Escherichia coli* exprimiert. Die H2-K^d und humane β 2-Mikroglobulin Einschlusskörperchen (β 2m) wurden in Gegenwart von p60₂₁₇₋₂₂₅ (Biosynthan, Berlin) gefalten. Durch Verwendung der Biotin-Protein-Ligase BirA wurden die gefalteten Komplexe, bestehend aus H2-K^d, β 2m und p60₂₁₇₋₂₂₅ Antigen-Peptid, enzymatisch biotinyliert. Die Verbindung zu einem viergliedrigen Tetramer erfolgte durch Phycoerythrin (PE)-gekennzeichnetes Streptavidin (SA-PE, Molecular Probes, Eugene, USA). Nach Aufreinigung durch Gelfiltration wurden die

Tetramere in einer Konzentration von 2-5 mg/ml bei 4-8°C in PBS (pH 8,0), welches 0,02 % Natriumazid, 1 mg/ml Pepstatin, 1 mg/ml Leupeptin und 0,5 ml EDTA enthielt, dunkel gelagert [85, 86].

2.9. Molekularbiologische Methoden

2.9.1. Kultivierung von *S. typhimurium*

Eine 3 ml Luria-Bertani-Lösung mit 50 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Ampicillin wurde mit dem Stamm SB824 (pHR241) beimpft und über Nacht bei 37°C und 180 Umdrehungen pro Minute (rounds per minute, rpm) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Übernachtskultur in LB NaCl 0,3 M im Verhältnis 1:40 verdünnt und wieder bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Nach etwa drei bis vier Stunden wurde mit einem Photometer bei 600 nm Wellenlänge die optische Dichte der Kultur bestimmt. Nach der Formel

$$OD\ 1,0 = \frac{5 \times 10^8\ CFU}{1\ ml}$$

wurde die aktuelle Anzahl von Salmonellen in der Kultur berechnet. Die benötigte Menge an Kulturflüssigkeit wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Ziel - Konzentration}}{\text{Ist - Konzentration}} \times \text{Zielvolumen} .$$

Diese Flüssigkeitsmenge wurde mit 8000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und nach Abschütten des Überstandes in dem festgelegten Zielvolumen gelöst. Dieses betrug 20 µl PBS für jede zu immunisierende Maus.

2.9.2. Sensitivität von SB824 gegenüber Ciprofloxacin

Zur Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBC) von Ciprofloxacin gegenüber dem Impfstamm SB824 (pHR241) wurde die antimikrobielle Wirkung des Antibiotikums in verschiedenen Verdünnungsstufen getestet. Eine LB-Lösung mit den Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) wurde hergestellt. Die Nährlösung wurde mit mehreren Kolonien SB824 (pHR241) beimpft und bei 37°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung im Verhältnis 1:20 mit LB-Medium verdünnt und erneut bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Nach etwa zwei Stunden wurde durch Photometrie (siehe Kapitel „Kultivierung von *Salmonella*“) die Anzahl der Bakterien in der Lösung bestimmt und die Lösung auf eine Konzentration von 5×10^5 CFU/20 µl („colony forming units“, Kolonie bildende Einheiten) verdünnt. Parallel dazu wurden

Reagenzgläser mit jeweils 1 ml LB-Medium und zusätzlich Ciprofloxacin in den Konzentrationen 1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml sowie 0,1 µg/ml hergestellt. Jedes Reagenzglas wurde mit 20 µl der zuvor erstellten Salmonellen-Lösung beimpft. Das entsprach pro Reagenzglas 5×10^5 CFU. Die beimpften Ciprofloxacinlösungen wurden wiederum über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Nach 24 Stunden wurden jeweils 100 µl aus jeder Probe auf Agarplatten ausgestrichen. Als bakterizide Wirkung der jeweiligen Ciprofloxacin-Konzentration wurde eine Reduktion der *Salmonella* CFU in der Lösung um 99,9 % definiert.

2.9.3. Kultivierung von *L. monocytogenes*

Der Stamm LM 10403s [83] lagerte bei -20 °C in einer BHI-Glycerinkultur. Davon wurden 10 µl in 10 ml BHI gegeben und bei 90 rpm und 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung 1:20 verdünnt und wiederum für zwei Stunden inkubiert. Nach der Formel

$$OD_{0,1} = \frac{2 \times 10^5 \text{ CFU}}{100 \mu\text{l}}$$

wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm die Listerien-Konzentration photometrisch ermittelt. Anhand der unter „Kultivierung von *S. typhimurium*“ genannten Methode wurde eine Konzentration von 2×10^4 CFU/100 µl in PBS hergestellt.

2.10. Tierexperimentelle Versuche

2.10.1. Orale Immunisierung von Mäusen mit Salmonellen

Am Tag vor der Immunisierung erhielten die Mäuse eine Vorbehandlung mit dem Antibiotikum Streptomycin. Hierzu wurden 20 mg Streptomycin gelöst in 100 µl H₂O oral über eine Schlundsonde verabreicht [87]. Einige Stunden vor der Immunisierung wurde den Mäusen Wasser und Futter entzogen. Sie waren somit zum Zeitpunkt der Immunisierung nüchtern. Die Salmonellen-Suspension enthielt 5×10^8 CFU SB824 (pHR241) gelöst in 20 µl PBS. Jede Maus wurde mit einer 20 µl Pipette langsam gefüttert, bis die gesamte Menge verschluckt war. Das Inokulum wurde anschließend zur Dosiskontrolle in entsprechender Verdünnung auf LB-Platten aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.10.2. Applikation von Ciprofloxacin

Zur Manipulation der Kolonisierungskinetik des *Salmonella*-Impfstammes wurde das Antibiotikum Ciprofloxacin verwendet [81]. In ersten Experimenten zur Ermittlung einer

geeigneten Applikationsart wurde die intravenöse mit der intraperitonealen Verabreichung verglichen. Zusätzlich wurde das Antibiotikum in beiden Gruppen auch oral appliziert. Die Behandlung erfolgte im Abstand von 12 Stunden über 4 Tage. Daraus ergaben sich 8 Einzeldosen. Die Dosis bei der intraperitonealen und intravenösen Verabreichung betrug 0,5 mg Ciprofloxacin, gelöst in 50 µl destilliertem Wasser (H_2O_{dest}). Die oral verabreichte Menge betrug ebenfalls 0,5 mg, gelöst in 50 µl H_2O_{dest} . Hieraus ergaben sich eine Ciprofloxacinkonzentration von 10 mg/ml H_2O_{dest} und eine Gesamtdosis von 2 mg Ciprofloxacin pro Maus pro Tag. Als Vergleichsgruppe dienten Mäuse, die nur den *Salmonella*-Impfstamm ohne weitere Intervention erhielten.

Bei allen nachfolgenden Experimenten wurde das Ciprofloxacin kombiniert intraperitoneal und oral verabreicht. Dieses geschah über 4 Tage im Abstand von jeweils 12 Stunden. Die Dosis bei der intraperitonealen Applikation betrug 1 mg Ciprofloxacin gelöst in 500 µl H_2O_{dest} (2 mg Ciprofloxacin/ml H_2O_{dest}), die oral verabreichte Dosis betrug 0,5 mg Ciprofloxacin gelöst in 50 µl H_2O_{dest} (10 mg Ciprofloxacin/ml H_2O_{dest}). Hieraus ergab sich eine Gesamtdosis von 3 mg Ciprofloxacin pro Maus pro Tag.

2.10.3. Organentnahme

Zur Organentnahme wurden Mäuse durch Inhalation von CO_2 -Gas getötet. Die äußere Desinfektion erfolgte durch Baden in einer 70 % Isopropanollösung. Zur Bestimmung des Grades der Kolonisierung durch *Listeria* oder *Salmonella* wurden nach medianem Bauchschnitt Zökum-Inhalt und die Milz entnommen. Proben wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß, das 500 µl PBS und eine Stahlkugel beinhaltet, auf Eis gelagert. Die Messung der p60-spezifischen $CD8^+$ T-Zell-Frequenz erfolgte durch Analyse von Splenozyten. Diese wurden aus der Milz gewonnen. Die Milzen wurden hierzu nach lateralem Bauchschnitt entfernt und in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 3 ml T-Zell-Medium auf Eis gelagert.

2.10.4. *Salmonella*-Kolonisierungsstudien

Zur Bestimmung der lokalen Darmkolonisierung und der systemischen Kolonisierung wurden stellvertretend Kot, Zökum-Inhalt und Milz der Mäuse untersucht. Die Stuhlproben wurden von der lebenden Maus aufgefangen, Zökum-Inhalt und Milz dagegen der toten Maus entnommen. Die Proben wurden mithilfe des Homogenisators für 3 Minuten bei einer Amplitude von ca. 70-80 homogenisiert. Das Gewicht einer Probe wurde mit einer

Feinwaage bestimmt. Verschiedene Verdünnungsreihen wurden auf LB-Agar aufgebracht. Nach Übernacht-Inkubation bei 37°C wurde die Anzahl der CFU determiniert. Die Organkolonisierung wurde danach durch Umrechnung in CFU pro Gramm angegeben. Die Besiedelung der Stuhlproben wurde in CFU pro Milligramm angegeben.

2.10.5. Belastungsinfektionen mit Listerien

Die Schutzversuche mit *L. monocytogenes* wurden am 12. Tag nach der Immunisierung durchgeführt. Listerien wurden wie oben beschrieben kultiviert. Jeweils 100 µl PBS mit 2×10^4 CFU *Listeria* wurde den Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Dazu wurden die Tiere zuvor für einige Minuten unter eine UV-Wärmelampe gestellt, damit die Schwanzvene besser sichtbar wurde. Zur Kontrolle der Infektionsdosis wurde die Listerien-Infektionsflüssigkeit, also das Inokulum, nach entsprechender Verdünnung auf BHI-Platten ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Drei Tage später, am 15. Tag nach Immunisierung, wurden die Mäuse getötet und die *Listeria* CFU Belastung in der Milz bestimmt. Dazu wurden die homogenisierten Milzen in verschiedenen Verdünnungsstufen auf BHI-Agarplatten aufgetragen und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Organkolonisierung durch Auszählen der CFU und Umrechnung in CFU pro Gramm angegeben.

2.11. Immunologische Methoden

2.11.1. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie („Fluorescence activated cell sorting“, FACS) eignet sich zur Charakterisierung und Analyse von Zellen und anderen Mikropartikeln wie beispielsweise Viren. Die zu analysierenden Zellen werden in der Regel speziell aufbereitet. Dazu werden sie mit bestimmten Antikörpern gefärbt. Diese Antikörper markieren charakteristische Strukturen der Zelle und sind in der Lage zu fluoreszieren. Häufig sind Antikörper gegen die CD-Moleküle („Cluster of differentiation“) der Zellen gerichtet. So können verschiedene Zellpopulationen voneinander abgegrenzt oder bestimmte Merkmale einzelner Zellen sehr genau untersucht werden. Bei der Durchflusszytometrie wird bestimmt, wie die einzelnen mit Antikörpern verbundenen Zellen einfallendes Laserlicht streuen und Fluoreszenz emittieren. Hierzu werden die Zellen durch einen Flüssigkeitsstrom gesaugt und einzeln mit Lasern verschiedener Wellenlänge angestrahlt. Hierdurch erhält man eine Information über Größe, Granularität und Fluoreszenz jeder Zelle einer Probe. Die Größe wird anhand der

Vorwärtsstreuung („forward light scatter“, FSC), die Granularität anhand der Seitwärtsstreuung („side scatter“, SSC) bestimmt. Unter Verwendung der fluoreszierenden Antikörper lassen sich dann weitere Eigenschaften der Analysezellen ermitteln. So können die bereits oben erwähnten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch Verwendung von fluoreszierenden CD8 Antikörpern und p60-Tetrameren selektiv quantifiziert und analysiert werden. Des Weiteren wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD127 und CD62L gefärbt. Diese lassen eine Untersuchung der Untergruppierungen antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen zu [81].

2.11.2. Aufbereitung der Splenozyten für die Tetramerfärbungen

Die induzierten CD8⁺ T-Zellen wurden in der Milz der Versuchstiere detektiert. Die Milzen lagerten in 3 ml T-Zell-Medium. In einem ersten Schritt wurden die Milzen mit dem Stempel einer 10 ml Spritze durch ein Zellsieb in eine Petrischale gedrückt und homogenisiert. Die Petrischale wurde mit 5 ml des T-Zell-Mediums ausgespült und das Homogenisat bei 1500 rpm und Raumtemperatur (RT) für sieben Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml ACT zwecks Erythrozytenlyse aufgenommen. Nach 7 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Lyse durch Zugabe von 5 ml des T-Zell-Mediums gestoppt und die Suspension erneut bei 1500 rpm und RT, für 7 Minuten zentrifugiert. Das annähernd weiße Pellet wurde erneut resuspendiert, in 10 ml Medium aufgenommen und durch einen Nylonfilter filtriert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden daraus 10 µl in 190 µl vorgelegte Trypanblau-Lösung gegeben. Aus dieser wiederum wurden 10 µl zur Bestimmung der Zahl der lebenden Zellen in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden die nicht blau gefärbten, also lebenden Zellen, gezählt. Nach der Formel

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl} \times \text{Volumen der Suspension} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

wurde danach die Gesamtzahl lebender Zellen in der Splenozyten-Suspension berechnet. Die nun gefilterte Suspension wurde erneut zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Pellet in der notwendigen Menge FACS-Medium (siehe Formel in Kapitel 1.9.1) gelöst, um eine Konzentration von 10⁸ Splenozyten/ml zu erreichen. Hieraus wurden jeweils 60 µl der Suspension in je ein Loch einer 96-Well Platte gegeben, so dass sich nun in jedem Analyse-Segment 6 x 10⁶ lebende Zellen befanden.

2.11.3. Färbung der Splenozyten

Die Färbung erfolgte in zwei Schritten: Einer Lebend/Tod-Färbung mit Ethidiumbromid Monoazid (EMA) und der anschließenden Tetramer-Färbung. Die Proben wurden permanent auf Eis gelagert. Zur späteren Lebend/Tod-Bestimmung wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer mit 0,1 % EMA und 1 % FC-Block für 20 Minuten unter einer Lampe gefärbt. EMA (2 mg/ml DPBS) eignet sich zur Markierung toter Zellen. Dabei diffundiert EMA während der Färbung in tote Zellen und bindet unter Lichteinfluss kovalent an die DNA. Hierdurch können tote Zellen während der späteren Auswertung der Durchflusszytometrie erkannt und ausgeschlossen werden. FC-Block ist gegen CD16/CD32 gerichtet und blockiert den FCγ-Rezeptor. Anschließend wurden die Proben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen.

Darauffolgend wurden die Zellen jeder einzelnen Probe in 50 µl FACS-Puffer für 60 Minuten im Dunkeln gefärbt. Der FACS-Puffer enthielt die folgenden Antikörper für die Tetramer-Färbung:

Tab. 7 Antikörper der Tetramer-Lösung

Antikörper	Menge	Verdünnungsfaktor
CD8 APC e Fluor 780	0,5 µl	1:100
CD62L FITC	0,5 µl	1:100
CD127 APC	1 µl	1:50
p60 PE (Tetramer)	1 µl	1:50

Zur Kompensation bei der späteren Durchflusszytometrie wurden außerdem je 5×10^6 Zellen aus einem Gemisch aller Proben in 50 µl FACS-Puffer zusammen mit einem der folgenden Antikörper, wie oben beschrieben, gefärbt:

Tab. 8 Antikörper zur Einzel-Färbung

Antikörper	Menge	Verdünnungsfaktor
CD8a PE	0,5 µl	1:100
CD8a FITC	0,5 µl	1:100
CD8 APC	0,5 µl	1:100
CD4 PerCP	0,5 µl	1:100
CD 8a APC eFluor 780	0,5 µl	1:100

Nach Ablauf einer Stunde wurden drei Waschschriffe mit FACS-Puffer durchgeführt, die gefärbten Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen, dunkel und kühl gelagert und innerhalb von zwei Stunden mit dem Durchflusszytometer FACSCantoTMII analysiert. Die

Auswertung der in der Durchflusszytometrie generierten Daten erfolgte unter zur Hilfenahme des Computerprogramms FLOWJO Flow Cytometry Analysis Software (Tree Star, Ashland).

2.12. Statistische Tests und Auswertung

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte durch den nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test. Für die Auswertung wurde die SPSS-Software (SPSS, Chicago, IL) verwendet. Dargestellt werden Mittelwerte mit Standardabweichung.

3. Ergebnisse

3.1. Immunisierung mit *S. typhimurium*

3.1.1. Induktion p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Durch die Immunisierung mit dem eingangs detailliert beschriebenen SB824 (pHR241) Impfvektor wurden CD8⁺ T-Zellen induziert, die spezifisch für das immunogene Epitop p60₂₁₇₋₂₂₅ des Bakteriums *L. monocytogenes* waren. Im Rahmen einer Belastungsinfektion vermittelten diese p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen Schutz vor einer üblicherweise tödlichen Dosis *L. monocytogenes* [57].

Die Menge der generierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde in der Milz der immunisierten Mäuse bestimmt. Die Milz ist als sekundäres lymphatisches Organ bedeutend für die Entstehung einer Immunantwort und lässt sich überdies auch praktisch entnehmen und verarbeiten [88]. Um die Menge der antigenspezifischen T-Zellen in der Milz zu detektieren, wurden die aufbereiteten Milzzellen durchflusszytometrisch untersucht.

Die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen konnten hierbei anhand der Antikörper gegen das CD8 Oberflächenprotein sowie der speziellen Tetramere identifiziert werden. Die Tetramere banden an die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen T-Zell-Rezeptoren. Abb. 4 zeigt exemplarisch die typischen Dot plots, die bei der Auswertung der FACS-Analyse beobachtet wurden. Die hier gezeigten T-Zell-Frequenzen wurden durch Untersuchung der Milz an Tag 11 nach der Immunisierung bestimmt.

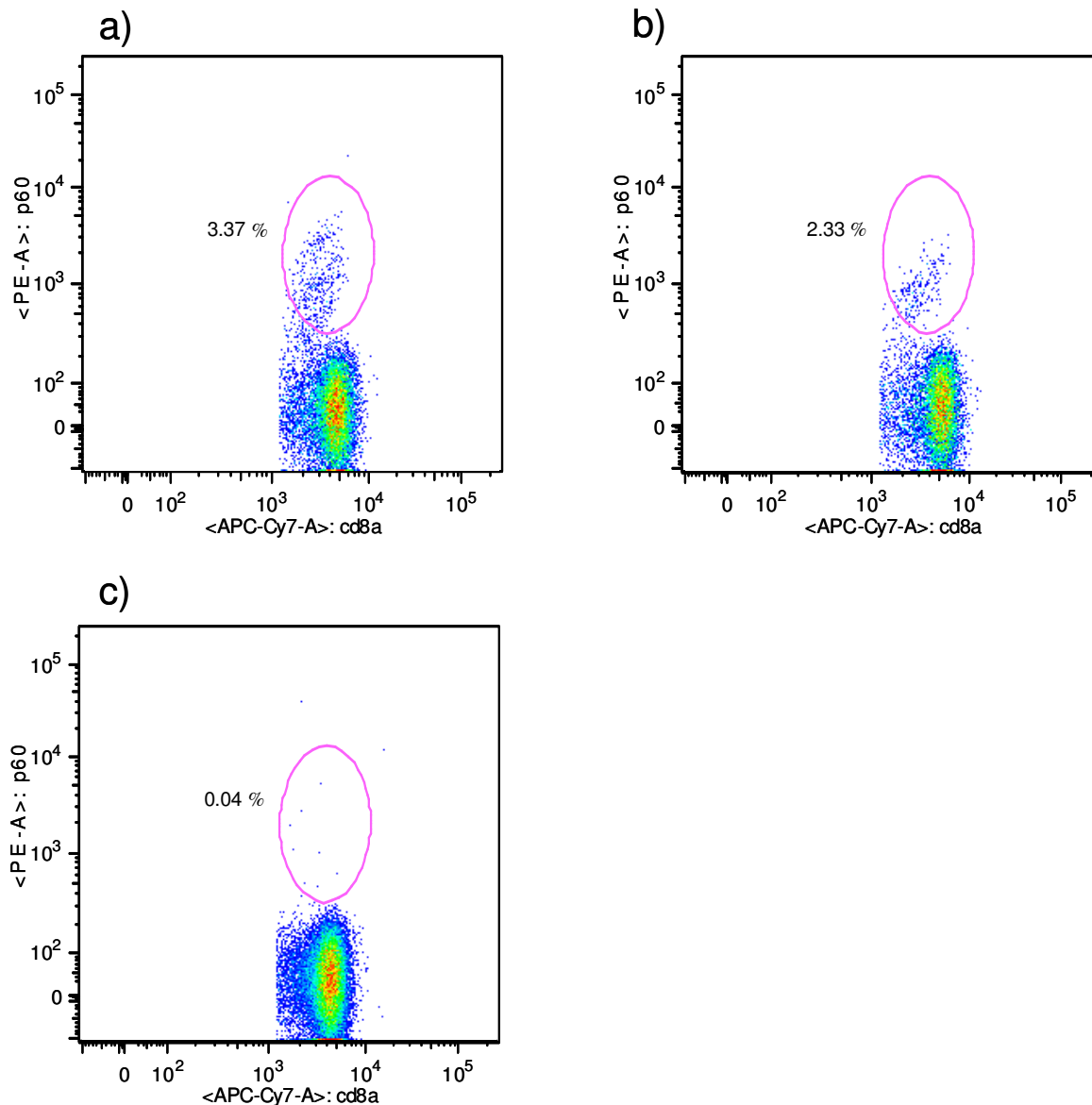


Abbildung 4 Durchflusszytometrie von Splenozyten. Gezeigt ist der Anteil p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen an den CD8⁺ T-Zellen der Milz. Hier werden exemplarisch die FACS-Analysen zweier BALB/c Mäuse (siehe a und b) dargestellt. Die Tiere wurden mit dem Impfvektor SB824 (pHR241) immunisiert. Die Messung der T-Zell-Frequenzen fand an Tag 11 nach der Immunisierung statt. Als Kontrolle diente eine nicht immunisierte Maus (siehe c).

In Abb. 5 wird detailliert visualisiert, wie mithilfe der FlowJo Software die durchflusszytometrisch generierten Daten ausgewertet wurden. In einem ersten Dot plot (Abb. 5.a) zeigten sich alle in der Probe vorhandenen Zellen, charakterisiert durch die Eigenschaft der Vorwärtsstreuung. Diese ist abhängig von der Fläche. FSC-A („Forward scatter area“) und FSC-H („Forward scatter height“) können vereinfacht als Breite und Höhe der Zelle interpretiert werden. In diesem ersten Auswertungsschritt sollten Zellen, die paarweise zusammenhafteten, aussortiert werden. Die rote Figur in Abb. 5.a stellt ein sog. Gate dar. Durch Erzeugung eines Gates war es möglich, eine Gruppe von Zellen auszuwählen und in einem weiteren Dot plot separat nach anderen Eigenschaften darzustellen. Alle einzelnen Zellen befanden sich bei dieser Ansicht tendenziell auf einer Geraden. Durch Erzeugung des roten Gates wurden die Einzelzellen ausgewählt und konnten in Fenster 5.b separat betrachtet werden. In dem zweiten dargestellten Dot plot waren somit nur noch die einzelnen Zellen vorhanden. Die Gruppe der Einzelzellen wird im Fenster 5.b anhand der Eigenschaften der Größe (FSC) und Granularität (SSC) dargestellt. Durch Erzeugen eines weiteren Gates, dem grünen Kreis in Abb. 5.b, wurden hieraus die Leukozyten für die weitere Auswertung selektiert. Alle Zellen aus dem Leukozyten-Gate erschienen dann in einem weiteren Dot plot (Abb. 5.c). Dort wurden anhand der Fluoreszenz des EMA- und des PE-Farbstoffes die toten Zellen durch Bildung des blauen Gates ausgeschlossen. Die toten Zellen zeichneten sich durch eine starke Aufnahme von EMA aus. Die verbliebenen lebenden Zellen wurden wiederum in einem Dot plot (Abb. 5.d) anhand der Marker für CD8 und dem Tetramer p60-PE aufgeführt. Hieraus wurden die CD8⁺ T-Zellen durch Erzeugung des gelben quadratischen Gates selektiert. Wie in Abb. 5.e deutlich wird, konnte danach der Anteil der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen (p60-PE Tetramer positiven) CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtmenge der CD8⁺ T-Zellen der Milz bestimmt werden (Abb. 5.e: orangefarbener Kreis). Es zeigte sich in der hier analysierten Milz, dass 1,8 % aller CD8⁺ T-Zellen p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen waren. Als Kontrollen bei den FACS-Analysen dienten die Milzen naiver, nicht immunisierter Mäuse. Dort betrug der Anteil p60₂₁₇₋₂₂₅-Tetramer positiver CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen zwischen 0,01 % und 0,05 %.

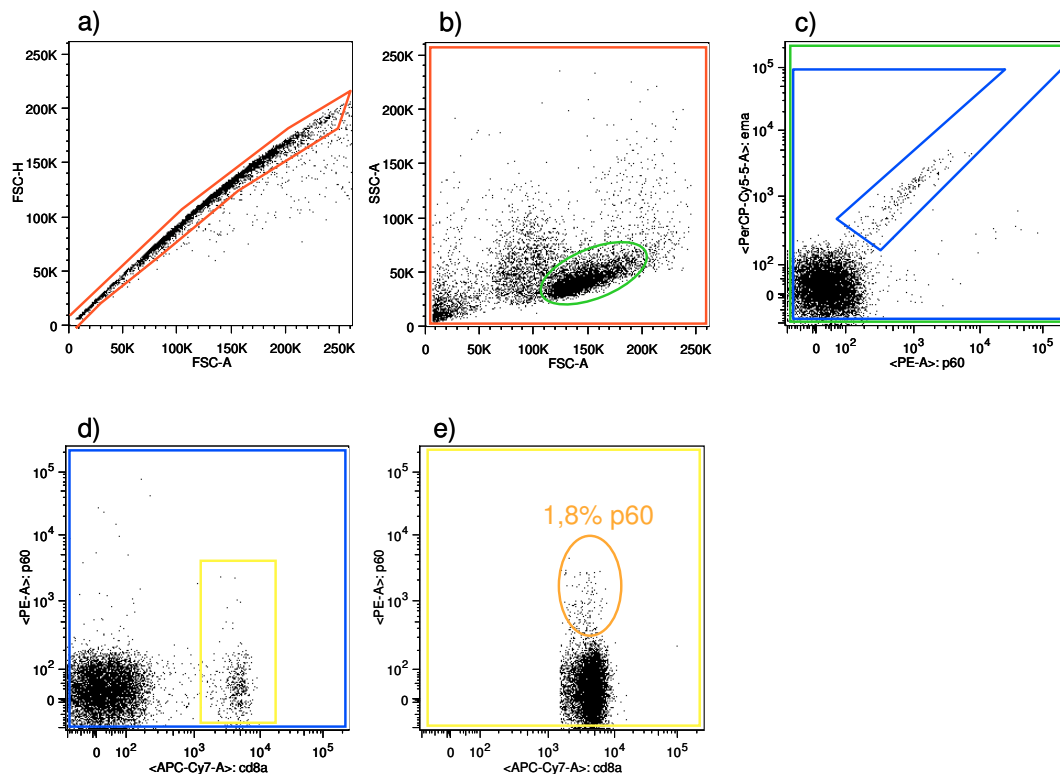


Abbildung 5 Schema der Auswertung von FACS-Analysen mithilfe der FlowJo-Software. Fenster a) beinhaltet alle isolierten Milzzellen. Durch den roten Ausschnitt werden hier alle einzelnen Zellen ausgewählt. Fenster b) beinhaltet die in a) ausgewählten einzelnen Zellen, durch den grünen Kreis werden Leukozyten ausgewählt. Fenster c) zeigt die in b) ausgewählten Leukozyten, durch die blaue Figur werden lebende Zellen ausgewählt. Diese werden in Fenster d) dargestellt. Dort werden durch das gelbe Rechteck die CD8⁺ T-Zellen ausgewählt. Fenster e) zeigt alle CD8⁺ T-Zellen, durch den orangefarbenen Kreis werden die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-

3.1.2. Kinetik der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Antwort

In den nachfolgenden Versuchen wurde die Entwicklung der Menge p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Immunisierung untersucht. Abb. 6 veranschaulicht die verschiedenen Versuchsgruppen. Die Mäuse der Gruppen 1-5 wurden am Tag 0 mit SB824 (pHR241) immunisiert. An den Tagen 6, 9, 10, 11 oder 18 wurde der Anteil p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen an den CD8⁺ T-Zellen der Milz durchflusszytometrisch bestimmt. In Abb. 7 wird die Kinetik der Entwicklung p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen gezeigt. Der Anteil p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen an den CD8⁺ T-Zellen der Milz betrug im Mittel 0,06 % ± 0,06 % in Versuchsgruppe 1 (an Tag 6), 0,09 % ± 0,11 % in Versuchsgruppe 2 (an Tag 9), 0,56 % ± 0,72 % in Versuchsgruppe 3 (an Tag 10), 1,38 % ± 0,89 % in Versuchsgruppe 4 (an Tag 11) und 1,58 % ± 0,73 % in Versuchsgruppe 5 (an Tag 18). Diese Versuche zeigten, dass ab Tag 11 mehr als 1 % der CD8⁺ T-Zellen spezifisch für p60₂₁₇₋₂₂₅ waren. Daher wurde für die nachfolgenden Untersuchungen über die Entwicklung

der Menge p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen bei veränderten Kolonisierungskinetiken der Tag 11 zur FACS-Auswertung ausgewählt.

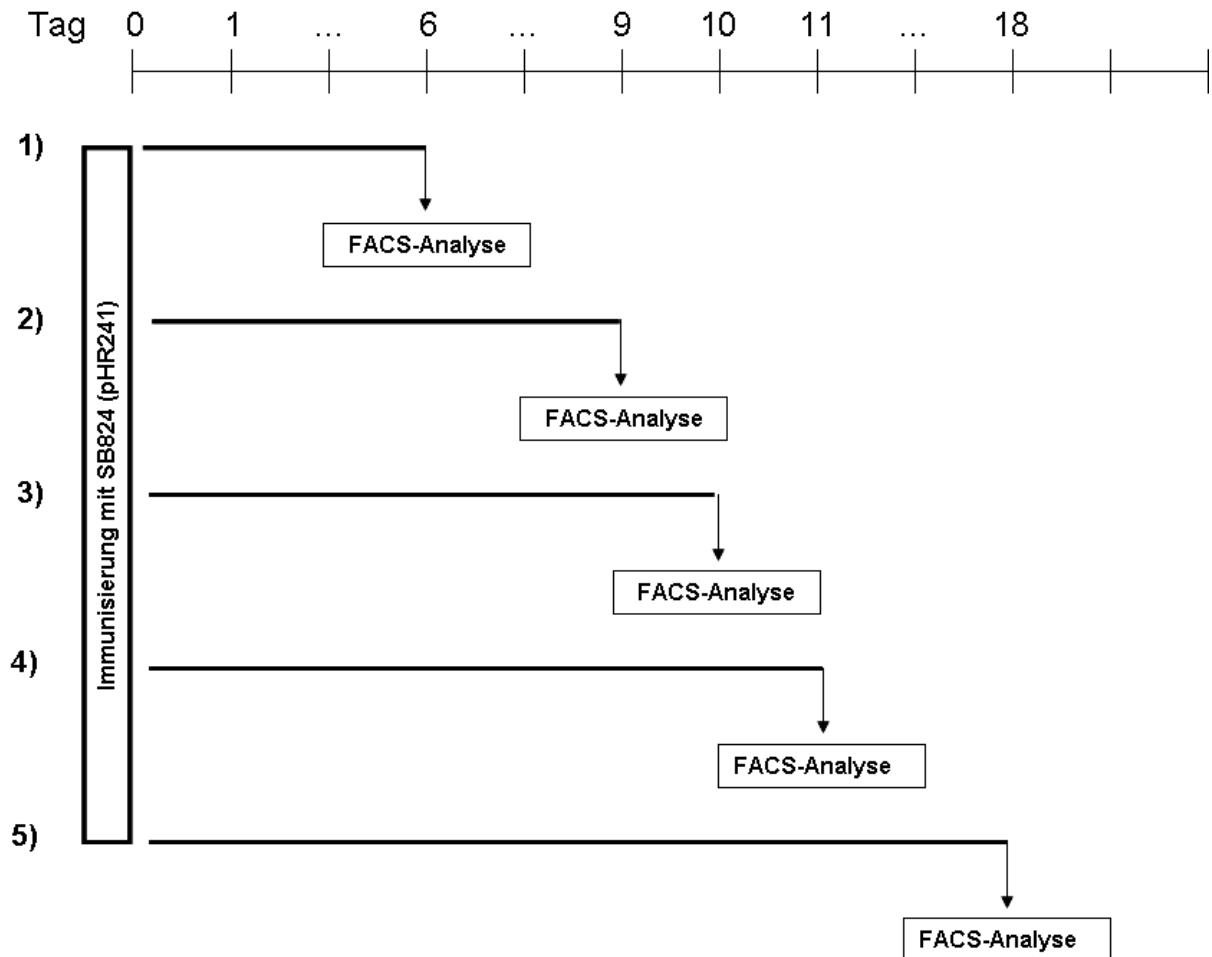


Abbildung 6 Versuchsgruppen 1-5. Mäuse wurden an Tag 0 mit SB824 (pHR241) immunisiert. An den Tagen 6 (Gruppe 1), 9 (Gruppe 2), 10 (Gruppe 3), 11 (Gruppe 4) und 18 (Gruppe 5) wurde die Anzahl p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Milz durchflusszytometrisch bestimmt. Jede Versuchsgruppe bestand aus 10 Mäusen.

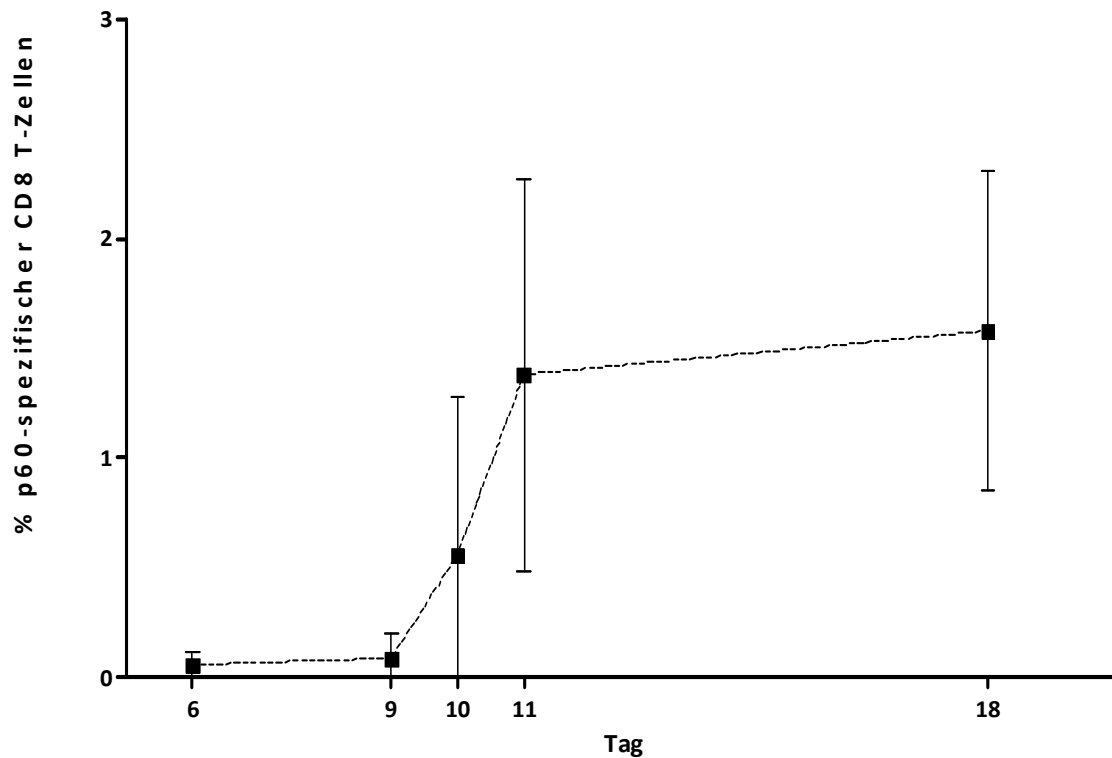


Abbildung 7 Kinetik der Entwicklung p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Milz (Versuchsgruppen 1-5). Mäuse wurden mit SB824 (pHR241) immunisiert. An den Tagen 6 (Versuchsgruppe 1), 9 (Versuchsgruppe 2), 10 (Versuchsgruppe 3), 11 (Versuchsgruppe 4) und 18 (Versuchsgruppe 5) wurde die Menge p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Milz durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung des prozentualen Anteils p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen der Milz. Jede Gruppe bestand aus 10 Mäusen.

3.2. Beeinflussung der Kolonisierungskinetik durch Ciprofloxacin

3.2.1. Wirksamkeit von Ciprofloxacin *in vitro*

Zur Manipulation der Kolonisierungskinetik im Sinne einer Reduktion des Lebendimpfstoffes sollte den immunisierten Mäusen das Fluorchinolon Ciprofloxacin appliziert werden. Ziel war es zunächst, die Wirksamkeit des Antibiotikums gegenüber dem Stamm SB824 (pHR241) *in vitro* zu ermitteln. Um eine ausreichende Sensitivität des Stammes SB824 (pHR241) gegenüber dem Antibiotikum sicherzustellen, wurde die MBC *in vitro* bestimmt. Die niedrigste Ciprofloxacinkonzentration, bei der 99,9 % der Salmonellen in einer Testkultur getötet wurden, lag bei 1 µg/ml.

3.2.2. Applikationswege von Ciprofloxacin

Der nächste Schritt bestand in der Etablierung einer Ciprofloxacinbehandlung in dem Maus-Immunisierungsmodell. Zur Entwicklung eines geeigneten Schemas zur Verabreichung des Antibiotikums wurde in einem Vorversuch die intravenöse mit der intraperitonealen Applikation verglichen. Drei Gruppen von jeweils 3 Mäusen wurden mit SB824 (pHR241) immunisiert (Abb. 8, Versuchsgruppen 6-8). Die Mäuse der Versuchsgruppe 6 dienten als Kontrollgruppe. Die Mäuse der Versuchsgruppe 7 erhielten das Antibiotikum oral und intravenös, die Mäuse der Versuchsgruppe 8 erhielten das Antibiotikum oral und intraperitoneal. Die Ciprofloxacinbehandlung wurde über 4 Tage jeweils zweimal täglich durchgeführt. Die Dosis bei der intraperitonealen und intravenösen Verabreichung betrug 0,5 mg Ciprofloxacin, gelöst in 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$. Die oral verabreichte Menge betrug ebenfalls 0,5 mg, gelöst in 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$. Die Konzentration betrug also jeweils 10 mg Ciprofloxacin pro ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$. Hieraus ergab sich eine Gesamtdosis von 2 mg Ciprofloxacin pro Maus pro Tag. Der Behandlungseffekt wurde durch Analyse der *Salmonella*-CFU-Belastung der Versuchsgruppen 6-8 an Tag 11 in der Milz bestimmt.

Abbildung 9 zeigt die mittlere *Salmonella*-CFU-Belastung pro g Milzgewebe. In der Versuchsgruppe 6 (Kontrollgruppe) wurden am Tag 11 nach der Immunisierung im Mittel 1568 ± 995 CFU pro g Milz detektiert. In der Versuchsgruppe 7 (orale plus intravenöse Ciprofloxacinapplikation) ließen sich an Tag 11 im Mittel 1356 ± 636 CFU pro g Milz nachweisen. In der Versuchsgruppe 8 (orale und intraperitoneale Ciprofloxacinapplikation) wurden am Tag 11 nach der Immunisierung im Mittel 1133 ± 472 CFU pro g Milz entdeckt. Die Unterschiede in den einzelnen Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Aufgrund der stärkeren Reduktion der Salmonellen in der Versuchsgruppe 8 (orale und intraperitoneale Applikation) und aufgrund technischer Schwierigkeiten bei mehrfacher intravenöser Injektion des Antibiotikums in die Schwanzvene der Mäuse wurde das Applikationsschema der Versuchsgruppe 8 für alle weiteren Versuche verwendet. Studien ergaben, dass bei einer Ciprofloxacinkonzentration größer als 2 mg/ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ die Gefahr der Ausfällung des Antibiotikums im Gewebe besteht; daher wurde die Konzentration der intraperitonealen Applikationslösung auf 2 mg/ml abgesenkt [89].

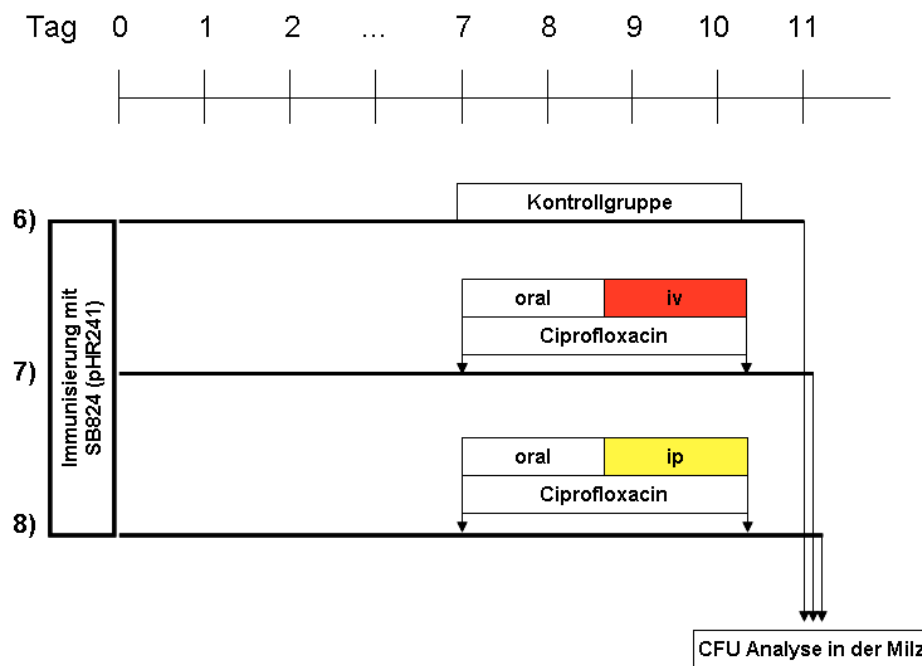


Abbildung 8 Versuchsgruppen 6-8, Verschiedene Applikationsarten des Ciprofloxacins. Mäuse wurden oral mit SB824 (pHR241) immunisiert. Mäuse der Versuchsgruppe 7 und 8 erhielten von Tag 7 bis Tag 10 Ciprofloxacin (8 Einzeldosen in 4 Tagen, 2 mg pro Maus pro Tag). In der Gruppe 7 wurde das Ciprofloxacin oral und intravenös verabreicht. In der Versuchsgruppe 8 wurde das Antibiotikum oral und intraperitoneal verabreicht. Versuchsgruppe 6 diente als immunisierte Kontrollgruppe. Am Tag 11 nach der Immunisierung wurde die Kolonisierung der Milz untersucht. Jede Gruppe bestand aus 3 Mäusen.

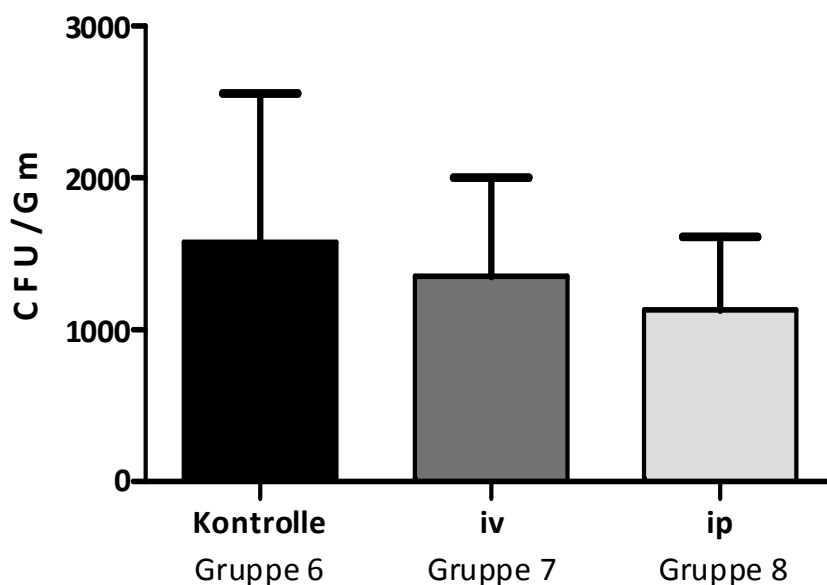


Abbildung 9 Vergleich der Applikationswege für die Ciprofloxacinbehandlung. Mäuse wurden oral mit SB824 (pHR241) immunisiert. Mäuse der Versuchsgruppe 7 und 8 erhielten von Tag 7 bis Tag 10 Ciprofloxacin (8 Einzeldosen in 4 Tagen, 2 mg pro Maus pro Tag). In Gruppe 7 wurde Ciprofloxacin oral und intravenös verabreicht. In Versuchsgruppe 8 wurde das Antibiotikum oral und intraperitoneal verabreicht. Versuchsgruppe 6 diente als immunisierte Kontrollgruppe. Am Tag 11 nach der Immunisierung wurde die Kolonisierung der Milz untersucht. Jede Gruppe bestand aus 3 Mäusen.

Aus diesen Vorversuchen ergab sich für alle folgenden Versuche eine Dosis von 0,5 mg Ciprofloxacin gelöst in 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ (10 mg Ciprofloxacin/ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$) für die orale Applikation, kombiniert mit 1 mg Ciprofloxacin gelöst in 500 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ (2 mg Ciprofloxacin/ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$) für die intraperitoneale Injektion des Antibiotikums. Die Dauer von 4 Tagen Behandlung wurde beibehalten. Hieraus resultierte eine Gesamtdosis von 3 mg Ciprofloxacin pro Maus pro Tag.

3.2.3. Wirksamkeit von Ciprofloxacin im Mausmodell

Nach Etablierung dieses Behandlungsregimes wurde der Effekt der Antibiotikabehandlung auf die Salmonellen-Kolonisierung der Mäuse weiter untersucht. In diesem Rahmen wurden Stuhlproben, Darminhalt und Milzen der Tiere analysiert.

In Abb. 10 werden die Versuchsgruppen zur Analyse der Ciprofloxacinwirkung anhand von Stuhlproben vorgestellt. Mäuse der Versuchsgruppen 9-12 wurden oral mit SB824 (pHR241) immunisiert. Die Gruppe 9 diente als immunisierte Kontrollgruppe. Die Mäuse der Gruppen 10, 11 und 12 wurden mit Ciprofloxacin nach dem zuvor erarbeiteten Schema behandelt. In Gruppe 10 begann die Behandlung an Tag 0, in Gruppe 11 begann die Behandlung an Tag 2 und in Gruppe 12 begann die Behandlung an Tag 4. Jede Versuchsgruppe bestand aus 10 Mäusen. Der Behandlungsbeginn an den Tagen 0, 2 und 4 wurde gewählt, da in späteren Versuchen (siehe Abb. 15) der Effekt dieses Behandlungsregimes auf die Induktion antigenspezifischer CD8^+ T-Zellen untersucht werden sollte. Um die unverzügliche Wirkung des Ciprofloxacins zu unterstreichen, wurde der Behandlungseffekt bereits 2 Tage nach Beginn der Ciprofloxacingabe ausgewertet. In Abb. 11 werden die Ergebnisse der Stuhluntersuchung zusammenfassend dargestellt.

Bei der Untersuchung von Stuhlproben wird der Behandlungserfolg durch das Fluorchinolon sehr deutlich. In einer immunisierten Kontrollgruppe (Versuchsgruppe 9) wurden am Tag 2 nach der Immunisierung im Mittel 35.798 ± 39.755 CFU/g Stuhl detektiert, am Tag 4 wurden 53.023 ± 42.163 CFU/g Stuhl gefunden und am Tag 6 wurden 51.545 ± 27.749 CFU/g Stuhl entdeckt. Im Gegensatz hierzu wurden in Versuchsgruppe 10 am Tag 2 im Mittel 0 ± 0 CFU/g Stuhl, in Versuchsgruppe 11 am Tag 4 im Mittel 0 ± 0 CFU/g Stuhl und in Gruppe 12 am Tag 6 im Mittel $0,4 \pm 1,26$ CFU/g Stuhl nachgewiesen. Bei der Analyse der Stuhlproben konnte eine Reduzierung des Impfvektors um mehr als 5 Log-Stufen durch eine zweitägige Ciprofloxacingabe beobachtet werden.

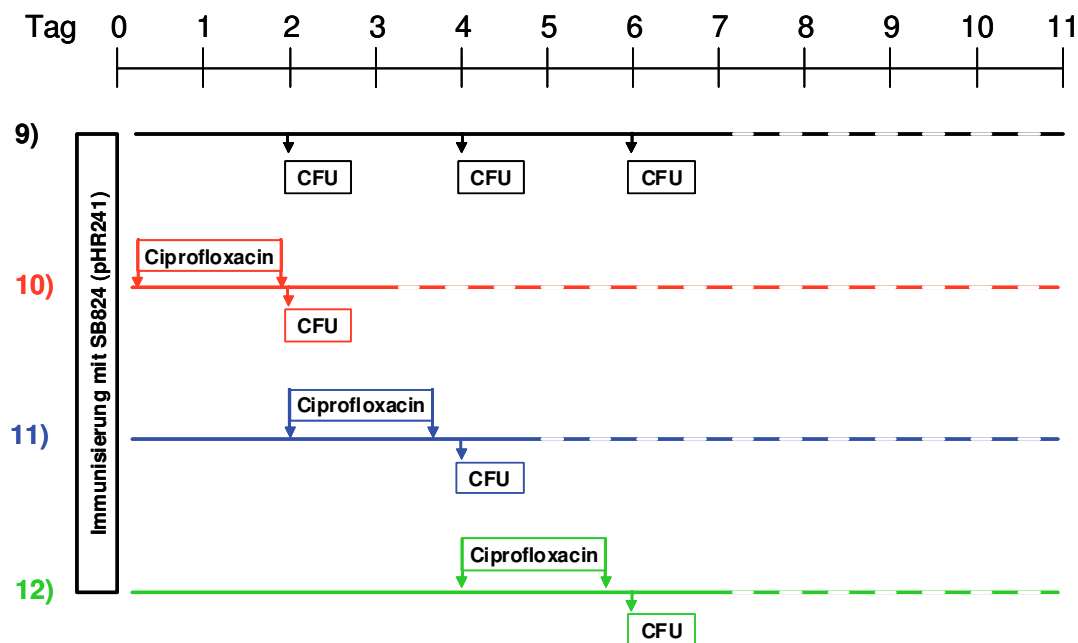


Abbildung 10 Untersuchung der Ciprofloxacinwirkung anhand von Stuhlproben - Schematische Darstellung der Versuchsgruppen 9-12. Mäuse aller Gruppen wurden mit SB824 (pHR24:1) immunisiert. Die Versuchsgruppe 9 (schwarze Gerade) diente als Positivkontrolle. In Stuhlproben der Mäuse wurde die Salmonella-CFU-Menge an den Tagen 2, 4 und 6 untersucht. Die Mäuse der Gruppe 10 (rote Gerade) wurden an den Tagen 0 und 1 mit Ciprofloxacin behandelt. Am Tag 2 wurde die Salmonella-CFU-Menge in Stuhlproben bestimmt. Analog erhielten die Mäuse der Versuchsgruppe 11 (blaue Gerade) an den Tagen 2 und 3 und die Mäuse der Versuchsgruppe 12 (grüne Gerade) an den Tagen 4 und 5 Ciprofloxacin. Der Effekt der Ciprofloxacingabe wurde in Gruppe 11 an Tag 4 und in Gruppe 12 an Tag 6 anhand von Stuhlproben ermittelt. Hier wurde nur 2 Tage mit Ciprofloxacin behandelt, um den unverzüglichen Wirkungseintritt zu unterstreichen.

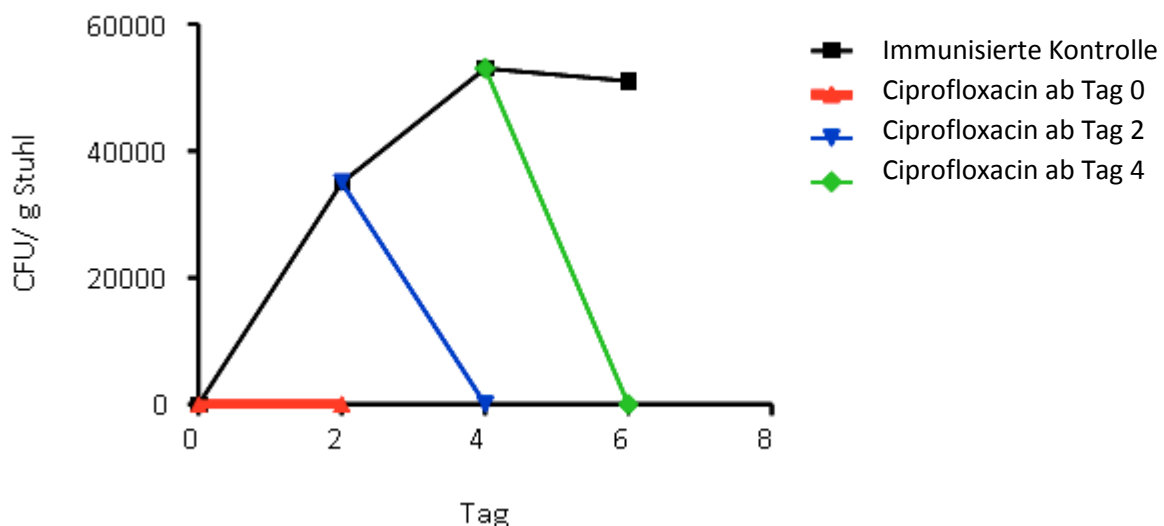


Abbildung 11 Untersuchung von Stuhlproben nach zweitägiger Ciprofloxacinbehandlung. Die schwarze Gerade zeigt die *Salmonella*-CFU-Menge in Stuhlproben immunisierter Mäuse an den Tagen 2, 4 und 6 (Versuchsgruppe 9). Die rote Gerade zeigte den Effekt einer Ciprofloxacingabe ab Tag 0 (Versuchsgruppe 10), die blaue Gerade verdeutlicht die Ciprofloxacinwirkung bei Gabe ab Tag 2 (Versuchsgruppe 11), die grüne Gerade zeigt die Reduktion der Anzahl der Salmonellen bei Antibiotikagabe ab Tag 4 (Versuchsgruppe 12).

Nach erfolgreichem Nachweis der Ciprofloxacinwirkung in Stuhlproben sollte der Effekt von Ciprofloxacin auch direkt in einzelnen Organen der Mäuse untersucht werden. Der Versuchsaufbau wird durch Abbildung 12 verdeutlicht. Mäuse der Versuchsgruppen 13 und 14 wurden mit dem Impfstamm SB824 (pHR241) immunisiert. Die Behandlung mit Ciprofloxacin wurde in Gruppe 14 am Tag 4 begonnen. Gruppe 13 diente als immunisierte Kontrollgruppe. Bereits nach 2 Tagen der Antibiotikagabe wurden am Tag 6 Zökum und Milz der Mäuse analysiert. Als Zeitpunkt der Auswertung wurde der Tag 6 nach Immunisierung gewählt, da aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bekannt war, dass der Stamm SB824 (pHR241) zu diesem Zeitpunkt die Mäuse systemisch besiedelt. Nur so war ein Vergleich zwischen den Gruppen 13 und 14 möglich [90].

Aus Abb. 13 wird die Reduktion des Impfstammes durch die Antibiotikagabe in Versuchsgruppe 14 ersichtlich. Gezeigt ist hier der Effekt auf die Besiedelung von Zökum und Milz der Tiere. Mäuse der Versuchsgruppe 13 (immunisierte Kontrolle) zeigten am Tag 6 im Mittel eine Kolonisierung von 26957 ± 26316 CFU/mg im Zökum und 5997 ± 8265 CFU/g in der Milz. Die mit Ciprofloxacin behandelten Mäuse der Versuchsgruppe 14 zeigten am Tag 6 im Mittel eine Kolonisierung von 4 ± 11 CFU/mg im Zökum und 205 ± 179 CFU/g in der Milz. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen 13 und 14 waren hoch signifikant (Zökum: $p < 0,001$, Milz: $p < 0,01$)

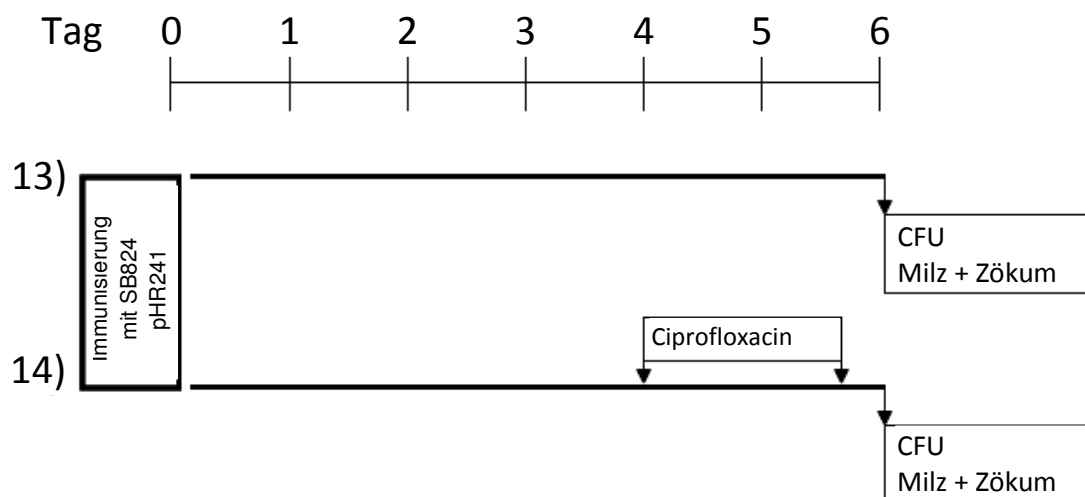


Abbildung 12 Versuchsgruppen 13 und 14 - Analyse der Ciprofloxacinwirkung in Zökum und Milz. Mäuse der Versuchsgruppen 13 und 14 wurden mit SB824 (pHR241) immunisiert. Mäuse der Gruppe 14 erhielten Ciprofloxacin an Tag 4 und 5. An Tag 6 wurde die Kolonisierung von Zökum und Milz bestimmt. Mäuse der Gruppe 13 dienten als immunisierte Kontrollgruppe. Jede Gruppe bestand aus 10 Mäusen.

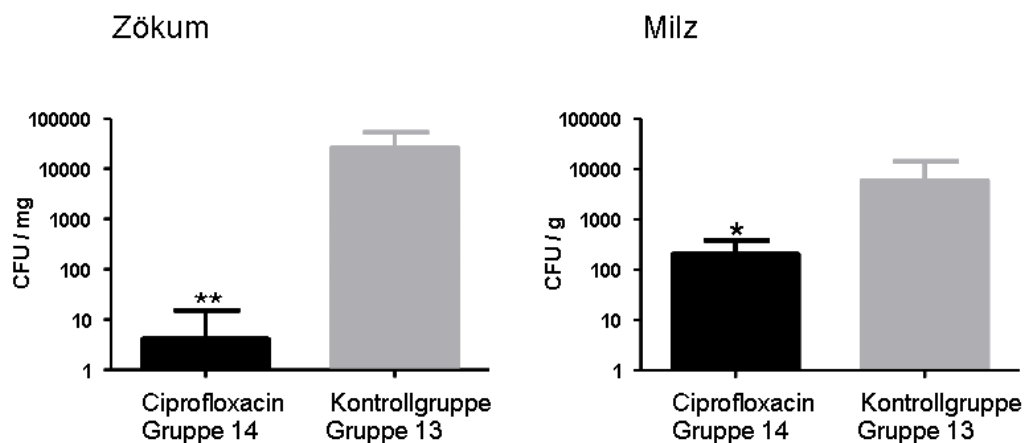


Abbildung 13 Versuchsgruppen 13 und 14 - Analyse der Ciprofloxacinwirkung in Zökum und Milz. Mäuse der Versuchsgruppen 13 und 14 wurden mit SB824 (pHR241) immunisiert. Mäuse der Gruppe 14 erhielten Ciprofloxacin an Tag 4 und 5. An Tag 6 wurde die Kolonisierung von Zökum und Milz bestimmt. Mäuse der Gruppe 13 dienten als immunisierte Kontrollgruppe. Jede Gruppe bestand aus 10 Mäusen. (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$).

3.3. Einfluss der Antibiotikagabe auf die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zell-Frequenz

Als nächster Schritt wurde der Einfluss dieser Impfvektorreduktion auf die Menge der induzierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen untersucht. Mäuse wurden mit dem Impfstamm SB824 (pHR241) immunisiert. Zur Vektorverringern wurde das Antibiotikum Ciprofloxacin nach dem zuvor erarbeiteten viertägigen Schema eingesetzt. Die Antibiotikagabe wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Immunisierung begonnen. Abb. 14 zeigt den Versuchsaufbau mit einer Zeittafel. Tiere der Versuchsgruppe 15, die nur die Immunisierung am Tag 0 empfangen, dienten als Positivkontrolle der Immunisierung. Mit dieser Versuchsgruppe wurden alle nachfolgenden Gruppen verglichen.

Bei den übrigen Gruppen (16-18) wurde die Kolonisierung durch den Lebendimpfstoff mithilfe einer Ciprofloxacingabe reduziert. Diese Reduktion des Impfvektors wurde an Tag 0, Tag 2 oder Tag 4 nach der Immunisierung begonnen. Ziel war es festzustellen, ab wann eine Impfvektorreduktion möglich ist, ohne die T-Zell-Induktion im Vergleich zur Positivkontrolle abzuschwächen oder zu verhindern. Daher wurden die Mäuse der Versuchsgruppe 16 bereits am Tag 0, etwa 10 Minuten nach der Immunisierung, erstmals mit Ciprofloxacin behandelt. In einer weiteren Gruppe wurde das Antibiotikum beginnend mit dem Tag 2 gegeben (Gruppe 17). Den Mäusen der letzten Gruppe wurde Ciprofloxacin ab Tag 4 verabreicht (Gruppe 18).

Am 11. Tag nach der Immunisierung wurde die Menge der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milz der Tiere durchflusszytometrisch bestimmt. In Abb. 15 wird der Vergleich dieser vier Gruppen dargestellt. In der Positivkontrollgruppe (Gruppe 15), in der über 11 Tage eine unbeeinflusste Kolonisierung durch *Salmonella* stattgefunden hatte, waren im Mittel 1,38 % ± 0,89 % der CD8⁺ T-Zellen in der Milz für das p60₂₁₇₋₂₂₅ Tetramer positiv. Wurde das Antibiotikum ab dem Tag 0 gegeben (Gruppe 16), waren am Tag 11 im Mittel 0,27 % ± 0,32 % der CD8⁺ T-Zellen der Milz p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen. Diese T-Zell-Frequenz war im Vergleich zur Positivkontrollgruppe (Gruppe 15) signifikant geringer ($p < 0,001$). Wurde mit der Vektorreduktion ab Tag 2 nach der Immunisierung begonnen (Gruppe 17), so konnten im Mittel 0,99 % ± 0,69 % p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen unter den CD8⁺ T-Zellen der Milz entdeckt werden. Bei dieser Versuchsgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Positivkontrollgruppe. Wurde das Antibiotikum ab Tag 4 nach der Immunisierung gegeben (Versuchsgruppe 18), so wurden im Mittel 1,51 % ± 1,08 % p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert. Es bestand hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu der Positivkontrollgruppe.

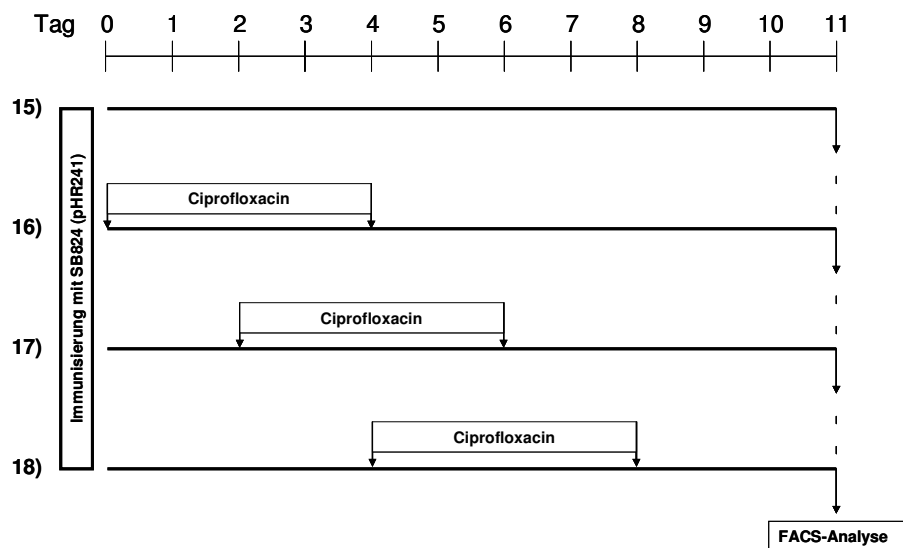


Abbildung 14 Einfluss der Kolonisierungskinetik auf die Induktion p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen - Versuchsgruppen 15-18. Mäuse der Versuchsgruppen 15-18 wurden mit SB824 (pHR241) immunisiert. Am Tag 11 nach der Immunisierung wurde die Frequenz p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Milz bestimmt. Die Versuchsgruppe 15 diente als Positivkontrolle. Mäuse der Versuchsgruppen 16-18 erhielten das Antibiotikum Ciprofloxacin mit Beginn von Tag 0, Tag 2 oder Tag 4. Das Ciprofloxacin wurde über 4 Tage nach zuvor beschriebem Schema verabreicht. Jede Gruppe bestand aus 10 Mäusen.

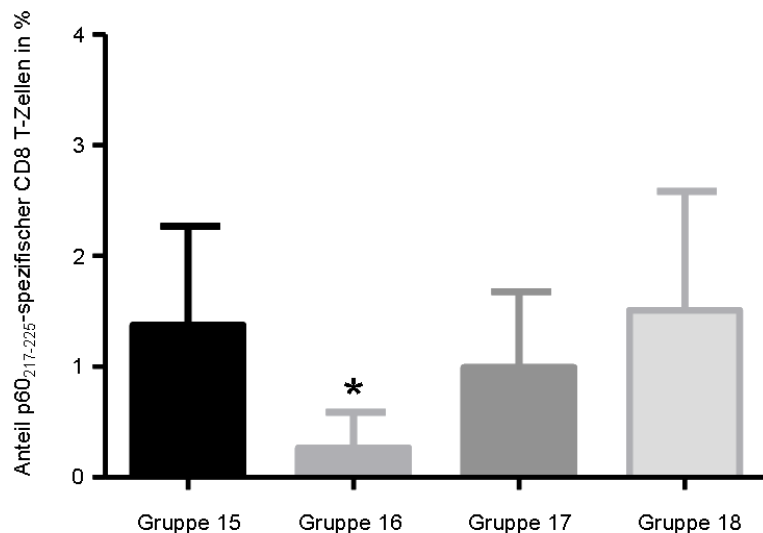


Abbildung 15 Einfluss der Ciprofloxacinbehandlung auf die Induktion p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺T-Zellen - Versuchsgruppen 15-18. Gezeigt ist die Frequenz p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺T-Zellen gemessen an Tag 11 in der Milz. Die Frequenz p60₂₁₇₋₂₁₅-spezifischer CD8⁺T-Zellen in Gruppe 16 (Ciprofloxacin ab Tag 0) ist signifikant niedriger als in Gruppe 15 (Kontrolle). Im Vergleich zwischen den Gruppen 17 (Ciprofloxacin ab Tag 2) und 18 (Ciprofloxacin ab Tag 4) mit Gruppe 15 (Kontrolle) besteht hingegen kein signifikanter Unterschied. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen resultieren aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 5 Tieren pro Gruppe. (* p < 0,001)

3.4. Einfluss der Antibiotikagabe auf die Funktionalität der p60₂₁₇₋₂₂₇-spezifischen CD8⁺T-Zellen

3.4.1. Methoden zur Analyse der T-Zell-Qualität

Es wurde deutlich, dass eine Kolonisierungszeit von nur 2 Tagen vor der erstmaligen Gabe einer Antibiotikadosis ausreichend ist, um eine große Menge p60-spezifischer CD8⁺T-Zellen zu induzieren. Daraufhin sollte überprüft werden, ob die induzierten T-Zellen auch Schutz vermitteln können. Hierzu wurden zwei Ansätze gewählt. Durch die Untersuchung der Untergruppen dieser Zellpopulation lässt sich eine erste Aussage über die Funktionalität antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen treffen. Die zweite Methode zur Kontrolle der Schutzfunktion p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺T-Zellen ist eine Belastungsinfektion mit dem Bakterium *L. monocytogenes* selbst. Beide Methoden wurden in dieser Arbeit durchgeführt und werden im Folgenden näher beschrieben.

3.4.2. T-Zell-Subpopulationen

Antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen lassen sich in mindestens drei Subpopulationen einteilen. Darunter die Effektor-T-Zellen (*effector T cells*: T_{EC}), die zentralen Gedächtniszellen (*central memory T cells*: T_{CMC}) und die Effektor-Gedächtniszellen (*effector memory T cells*: T_{EMC}) [91]. Der Großteil der antigenspezifischen T-Zellen wird von den kurzlebigen T_{EC} gebildet, die sich nach einer Antigenexposition rasch wieder zurückbilden. Die beiden Gedächtniszellpopulationen hingegen sind langlebiger. Die T_{EMC} wandern bevorzugt in nicht-lymphatische Organe und überleben dort für eine sehr lange Zeit. Beim erneuten Zusammentreffen mit dem Antigen können sie rasch proliferieren und Zytokine ausschütten. Die T_{CMC} hingegen verweilen in lymphatischen Geweben. Auch sie expandieren stark bei erneutem Antigenkontakt.

Von großer Bedeutung in *Listeria*-Infektionsmodellen sind die T_{EMC}. Diese spielen die Hauptrolle bei der Vermittlung des Schutzes vor einer Listerien-Infektion [92]. Es wurde daher untersucht, ob durch die Immunisierungsstrategie mit verschiedenen Kolonisierungskinetiken jeweils genügend T_{EMC} entstanden sind.

Anhand der Oberflächenantigene CD62L und CD127 können die T-Zell-Untergruppierungen unterschieden werden [92]. Die *homing*-Rezeptoren CD62L (L-selektin) und CCR7, ein Chemokinrezeptor, werden von T-Zellen benötigt, um in Lymphknoten einzutreten. Dort ermöglichen die *homing*-Rezeptoren den T-Zellen das Anhaften am Endothel der arteriellen Blutgefäße, damit diese durchwandert werden können [91, 93, 94]. T_{CMC} sind durch eine große Dichte dieser beiden Rezeptortypen auf ihrer Zelloberfläche gekennzeichnet. Sind diese beiden Rezeptortypen niedrig exprimiert, werden die T-Zellen als T_{EMC} bezeichnet [95]. Um die T_{EMC} und die Gruppe der T_{EC} zu unterscheiden, die beide CD62L in geringer Menge exprimieren, kann der Oberflächenmarker CD127 verwendet werden. CD127 ist die α -Kette des Interleukin-7-Rezeptors. Dieser wird auf allen ruhenden peripheren CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert [51]. T_{EC} exprimieren CD127 in geringer Menge, T_{EMC} exprimieren CD127 in großer Menge [93].

Zusammenfassend können die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen durch ein CD127^{low}/CD62L^{low} Expressionsmuster der T_{EC}, ein CD127^{high}/CD62L^{low} Expressionsmuster der T_{EMC} und ein CD127^{high}/CD62L^{high} Expressionsmuster der T_{CMC} beschrieben werden. Abb. 16 verdeutlicht diese unterschiedlichen Expressionsmuster.

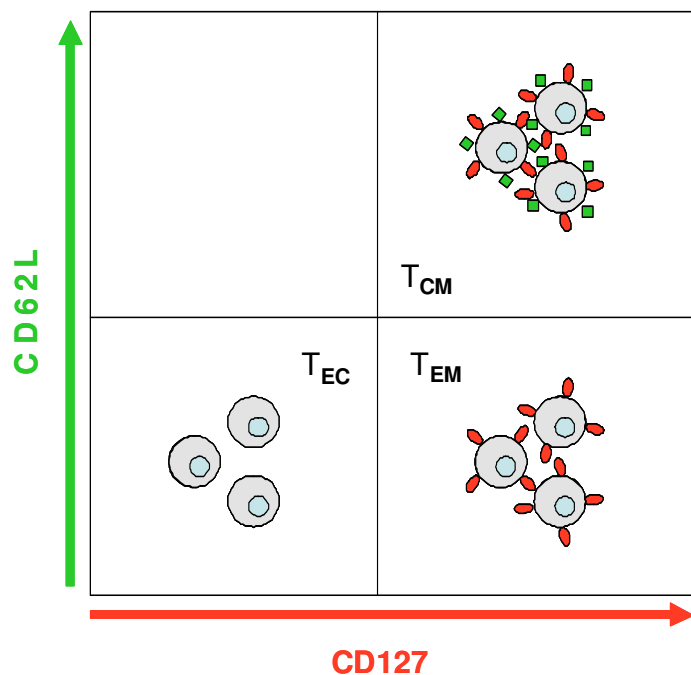


Abbildung 16 Unterscheidung der T-Zell-Subpopulationen anhand der Oberflächenmarker CD127 und CD62L. Antigen-spezifische CD8 T-Zellen können anhand der unterschiedlich ausgeprägten Expression von CD127 und CD62L in T_{EC} ($CD127^{low}/CD62L^{low}$), T_{CM} ($CD127^{high}/CD62L^{high}$) und T_{EM} ($CD127^{high}/CD62L^{low}$) unterteilt werden.

Um die Aufteilung der einzelnen T-Zell-Subpopulationen zu analysieren, wurden bei den FACS-Färbungen der Versuchsgruppen 15-18 am Tag 11 zusätzlich auch Färbungen für die Oberflächenmarker CD127 und CD62L durchgeführt. Die Auswertung der T-Zell-Subpopulationen wird in Abb. 17 dargestellt. Als Vergleichsstandard diente die Gruppe der Positivkontrolle der Immunisierung (Versuchsgruppe 15). Mit dieser Gruppe wurden die Gruppen mit Ciprofloxacingabe ab Tag 2 (Versuchsgruppe 17) und ab Tag 4 (Versuchsgruppe 18) verglichen. Die Ergebnisse der Versuchsgruppe 16 (Ciprofloxacin ab Tag 0) wurden aufgrund der sehr niedrigen p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Frequenzen nicht in diese Auswertung aufgenommen.

Die Mäuse der Versuchsgruppe 15 (Positivkontrolle) zeigten ein Verteilungsmuster der T-Zell-Subpopulationen von $8,8 \% \pm 6,5 \% T_{CM}$, $48,4 \% \pm 5,8 \% T_{EM}$ und $41,4 \% \pm 8,0 \% T_{EC}$. Im Vergleich hierzu wurde bei den Mäusen der Versuchsgruppe 18 (Antibiotikagabe ab Tag 4) kein signifikanter Unterschied in der Aufteilung der T-Zell-Subpopulationen festgestellt. Mäuse dieser Gruppe wiesen eine Aufteilung von $9,6 \% \pm 7,7 \% T_{CM}$, $48 \% \pm 6,0 \% T_{EM}$ und $38,3 \% \pm 13,2 \% T_{EC}$ auf. Die Mäuse der Versuchsgruppe 17 (Antibiotikagabe ab

Tag 2) zeigten signifikante Unterschiede in der Aufteilung der T-Zell-Subpopulationen im Vergleich mit Mäusen der Positivkontrollgruppe (Versuchsgruppe 15). In Versuchsgruppe 17 zeigte sich Verteilung von $7,1 \% \pm 3,4 \% T_{CMC}$, $36,7 \% \pm 8,2 \% T_{EMC}$ und $53,8 \% \pm 8,0 \% T_{EC}$ festgestellt. Hieraus wird deutlich, dass bei Versuchsgruppe 17 der Anteil der T_{EMC} im Vergleich zu Versuchsgruppe 15 signifikant niedriger war ($p < 0,01$). Gleichzeitig war der Anteil der T_{EC} bei Versuchsgruppe 17 im Vergleich zu Versuchsgruppe 15 signifikant höher ($p < 0,01$).

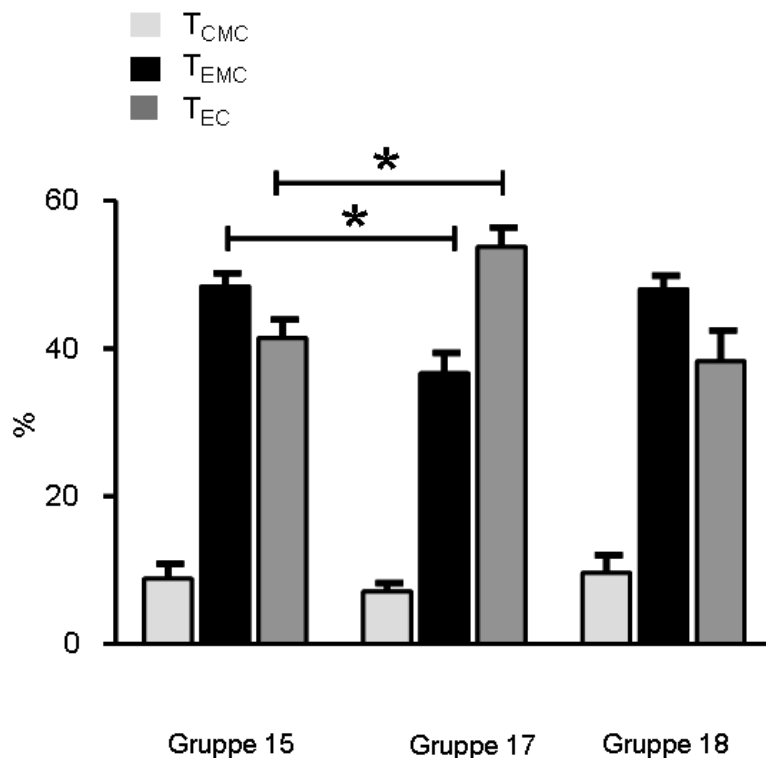


Abbildung 17 Aufteilung der CD8 T-Zell-Subpopulationen. Mäuse wurden mit dem Impfstamm SB824 (pHR241) immunisiert. Das Antibiotikum wurde mit Beginn ab Tag 2 oder Tag 4 verabreicht. Am Tag 11 wurden die Milzen der Tiere im Hinblick auf die induzierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8 T-Zell-Subpopulationen untersucht. Die gezeigten Mittelwerte und Standardabweichungen resultieren aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 5 Tieren pro Gruppe. (* $p < 0,01$)

3.4.3. Belastungsinfektionen mit *L. monocytogenes*

Die zweite Methode zur Analyse der Funktionalität der erzeugten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen besteht in der Belastungsinfektion der immunisierten Tiere mit *L. monocytogenes*. Die Listerien-Infektion des Menschen entsteht in der Mehrzahl aller Fälle durch kontaminierte Lebensmittel. Die Haupteintrittspforte ist der Gastrointestinaltrakt. Bei gesunden Individuen entsteht eine Gastroenteritis mit Fieber. Bei immungeschwächten

Patienten kann aber auch eine systemische Infektion mit Sepsis oder Enzephalitis auftreten [96]. Bei den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit wurden die Listerien den Mäusen intravenös injiziert. Der Versuchsaufbau der Belastungsinfektionen mit *Listeria* basierte auf einer Erweiterung der Versuchsgruppen 15-17. Der Versuchsaufbau der Versuchsgruppe 18 (Ciprofloxacin ab Tag 4) wurde für diese weiteren Studien nicht mehr verwendet. Die Schutzfunktion der in Versuchsgruppe 18 induzierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde als hinreichend bestätigt betrachtet, da sowohl die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische T-Zell-Frequenz als auch die Aufteilung der T-Zell-Subpopulationen bei dieser Gruppe nicht signifikant von den Werten der Positivkontrolle abwichen.

Die Versuchsgruppen 15.B, 16.B und 17.B – das „B“ steht für Belastungsinfektion – wurden mit SB824 (pHR241) immunisiert. Gruppe 15.B diente als Positivkontrolle der Immunisierung. Die Mäuse der Versuchsgruppen 16.B und 17.B erhielten eine viertägige Ciprofloxacinbehandlung mit Beginn an Tag 0 (Gruppe 16.B) oder an Tag 2 (Gruppe 17.B). Am 12. Tag nach der Immunisierung erhielten Mäuse der Gruppen 15.B, 16.B und 17.B eine Dosis von 2×10^4 CFU Listerien in die Schwanzvene injiziert. Als nicht-immunisierte Kontrollgruppe dienten naive BALB/c Mäuse. Diese bildeten die Versuchsgruppe 19. Diese Mäuse erhielten lediglich die Dosis von 2×10^4 CFU Listerien ohne weitere Vorbehandlung. Drei Tage später, an Tag 3 nach der Belastungsinfektion, wurden die Mäuse aller 4 Gruppen getötet und auf die *Listeria*-Belastung in der Milz untersucht. Abb. 18 zeigt diesen erweiterten Experimentaufbau.

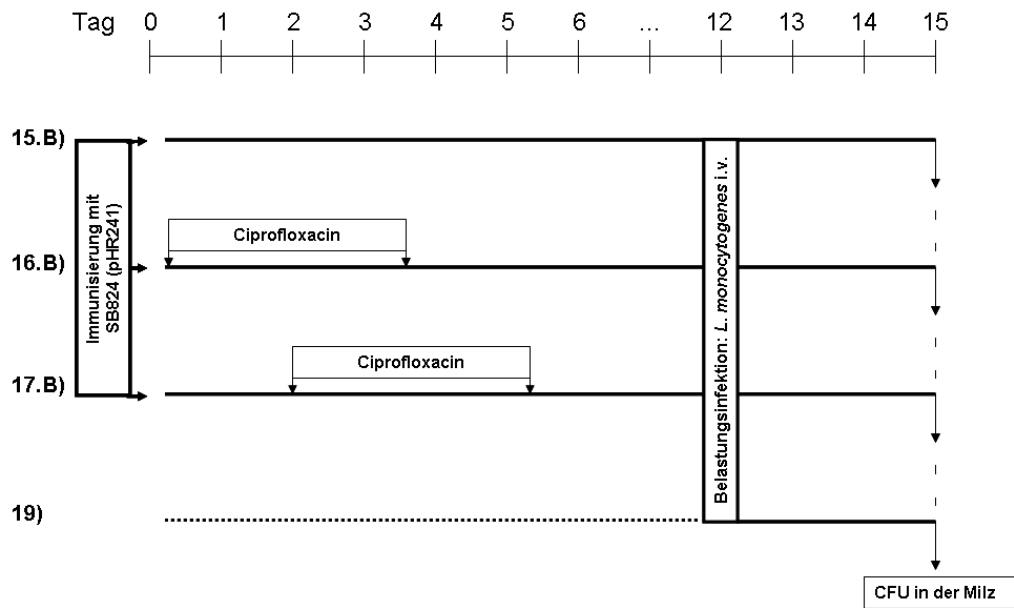


Abbildung 18 Versuchsgruppen 15.B-17.B + 19. Belastungsinfektionen mit *L. monocytogenes*. Mäuse der Versuchsgruppen 15.B-17.B wurden mit SB824 (pHR241) immunisiert. Mäuse der Versuchsgruppe 19 dienten als nicht immunisierte Kontrollgruppe. Am Tag 12 wurde den Mäusen aller Gruppen eine letale Dosis *L. monocytogenes* (2×10^4 CFU) intravenös injiziert. Am Tag 3 nach der Belastungsinfektion mit *Listeria* bzw. Tag 15 nach der Immunisierung mit *Salmonella* wurde die Menge der Listerien in der Milz der Mäuse bestimmt.

In Abb. 19 ist die Auswertung der Belastungsinfektionen zusammenfassend dargestellt. Die Gruppe der naiven Mäuse (Versuchsgruppe 19) wurde in hohem Maße durch die Listerien kolonisiert. In den Milzen dieser Tiere wurden im Mittel $2,1 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^8$ CFU/g gefunden. Mäuse der positiven Immunisierungskontrollgruppe (Versuchsgruppe 15.B) hingegen waren sehr gut geschützt. Bei 8 von 10 Tieren waren in der Milz keine Listerien zu finden. In zwei Mäusen konnten in der Milz Listerien detektiert werden. Eine dieser Milzen war mit 490 CFU/g, eine weitere mit 13 CFU/g kolonisiert. Hieraus ergab sich eine mittlere Kolonisierung von 50 ± 155 CFU/g in Versuchsgruppe 15.B. Wurde die Kolonisierungskinetik durch eine Antibiotikaverabreichung ab dem Tag 0 manipuliert (Versuchsgruppe 16.B), so waren die Tiere signifikant schlechter geschützt ($p < 0,001$). Bei diesen Tieren wurde eine durchschnittliche *Listeria*-Belastung von $4,6 \times 10^7 \pm 4,6 \times 10^7$ CFU/g Milz gemessen. Wurde die Kolonisierung durch den Impfvektor hingegen erst ab Tag 2 nach der Immunisierung durch Ciprofloxacin verringert (Versuchsgruppe 17.B), so stellte sich wiederum ein wirksamer Schutz ein. Die Mäuse dieser Versuchsgruppe waren mit durchschnittlich 391 ± 527 CFU/g Milz besiedelt. Obwohl in der Aufteilung der CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen ein

signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen 15 (positive Immunisierungskontrolle) und 17 (Ciprofloxacin ab Tag 2) bestand (siehe Abb. 17), konnte kein signifikanter Unterschied in der Schutzfunktion der induzierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen beider Gruppen festgestellt werden.

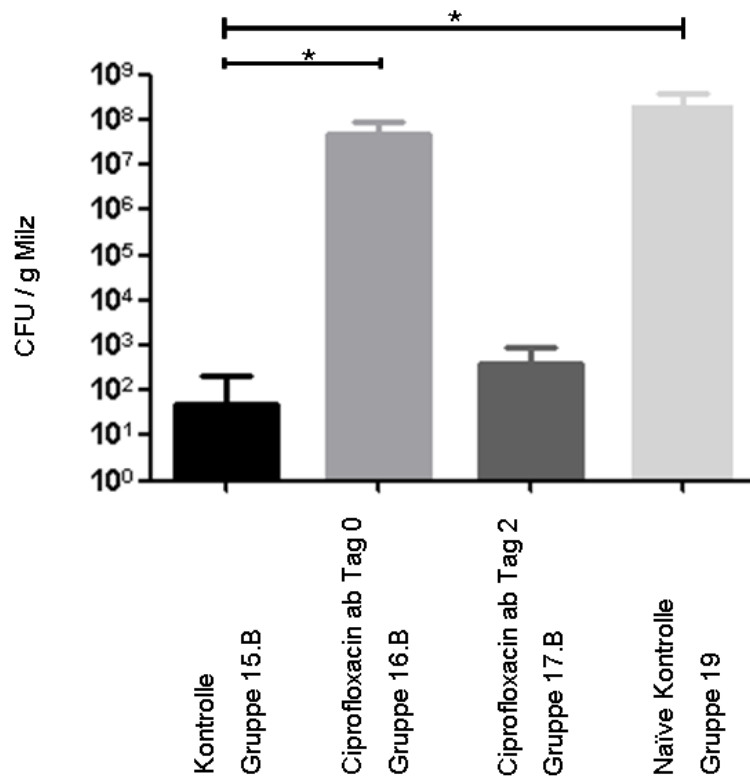


Abbildung 19 Belastungsinfektion mit *L. monocytogenes* – Versuchsgruppen 15.B-17.B + 19. BALB/c Mäuse der Gruppen 15.B-17.B wurden mit SB824 (pHR241) immunisiert. Mäuse der Gruppe 19 dienten als naive Kontrolle. Mäusen der Gruppen 16.B und 17.B wurde das Ciprofloxacin mit Beginn von Tag 0 (Gruppe 16.B) oder 2 (17.B) verabreicht. Am Tag 12 erhielten alle Gruppen eine Belastungsinfektion mit 2×10^4 CFU *L. monocytogenes*. Am Tag 15 (Tag 3 nach der Belastungsinfektion) wurde die Menge an Listerien in der Milz der Mäuse ermittelt. Die gezeigten Mittelwerte und Standardabweichungen resultieren aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 5 Tieren pro Gruppe. (* $p < 0,001$)

4. Diskussion

4.1. *Salmonella*-Impfvektoren

Wie in der Einleitung beschrieben, besteht der Bedarf zur Entwicklung von Impfstoffen, die antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen induzieren. Diese Impfstoffe sollen in der Prävention und Therapie einer Vielzahl von Krankheiten eingesetzt werden. Hierzu zählen Krankheiten, die durch intrazellulär replizierende Erreger verursacht werden, ebenso wie Krebs- oder Autoimmunerkrankungen. Robinson und Amara beschreiben fünf Kategorien von Impfstoffen, die zur Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen imstande sind [29]. Vertreter der ersten Gruppe sind die abgeschwächten viralen und bakteriellen Lebendimpfstoffe. Die zweite und dritte Gruppe bilden replikationsfähige bzw. nicht-replikationsfähige Lebendvektoren. Die vierte Gruppe besteht aus DNA-Impfstoffen, die fünfte Gruppe wird von heterologen Prime-Boost-Impfstoffen repräsentiert. Bei Impfungen mit Prime-Boost-Impfstoffen wird das gleiche Antigen auf zwei verschiedene Arten präsentiert. Diese Strategie wurde erstmals bei der Entwicklung von HIV-Impfstoffen angewendet [97] und danach auf andere Fragestellungen übertragen [98].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein attenuierter *S. typhimurium*-Stamm als lebender Vektor für heterologe Antigene im Maus-Immunisierungsmodell verwendet. Formal und Kollegen setzten im Jahr 1981 erstmals einen *S. typhi*-Stamm als Vektor für heterologe Antigene ein [99]. Der Typhus-Lebendimpfstoff Ty21a wurde genetisch modifiziert, um ein Oberflächenantigen von *Shigella sonnei* zu sekretieren. Nach oraler Immunisierung waren Mäuse nicht nur gegen Typhus, sondern auch gegen Shigellose geschützt.

Rüssmann und Kollegen entwickelten eine neue Methode zur Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen, welche dieser Arbeit zugrunde liegt. Das *Salmonella*-T3SS wurde verwendet, um Modellantigene direkt in das Zytosol von APCs zu translozieren. Aufgrund der zytosolischen Lokalisation wurde das Antigen über den MHC Klasse I-Antigenpräsentationsweg prozessiert, wodurch im Mausmodell antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen generiert werden konnten [53, 57, 79]. Durch diese Impfstrategie konnte in experimentellen Ansätzen Immunität gegenüber Viren, Bakterien und Tumoren erzeugt werden [53, 57, 100-103]. Zudem konnten Roeder und Kollegen die therapeutische Wirksamkeit dieser Impfmethode bei murinen Fibrosarkomen nachweisen [104].

Zur besonderen Eignung von Salmonellen als Vakzin-Vektor zählen Zhang und Kollegen verschiedene Gründe auf [105]:

1. Das Genom von *Salmonella* lässt sich einfach manipulieren.
2. Durch *S. typhimurium* ist ein Mausmodell zur Erforschung der Pathomechanismen des *Typhus abdominalis* vorhanden [32].
3. Mit Ty21a ist bereits ein oraler Lebendimpfstoff gegen Typhus beim Menschen erprobt und zugelassen [33].

Cheminay und Hensel weisen auf den Vorteil hin, dass rekombinante Salmonellen-Stämme oral verabreicht werden können. Über den natürlichen Infektionsweg verabreichte *Salmonella*-Impfvektoren sind in der Lage, eine mukosale und systemische Immunität zu induzieren. Hierbei werden sowohl humorale wie auch zelluläre Immunantworten generiert [106]. Kotton und Hohmann merken zwei weitere Vorzüge bakterieller Lebendvektoren an: zum einen ist die Produktion der Impfstoffe als sehr kostengünstig zu beurteilen, zum anderen wird aufgrund der einfachen Applikation eine gute Compliance bei den Patienten gewährleistet. Kotton und Hohmann erläutern auch Nachteile und Risiken oraler Lebendimpfstoffe. Zu den Risiken zählen sie die Möglichkeit einer ungewollten systemischen Ausbreitung des Impfvektors, die Gefahr der Übertragung des Vektors auf Kontaktpersonen des Impflings oder eine mögliche Kontamination der Umwelt mit den rekombinanten Bakterien. Die ungewollte systemische Ausbreitung des Impfstoffes könnte gesunde, besonders aber auch abwehrgeschwächte Patienten betreffen [73].

Eine Studie an Krebspatienten deckte weitere Risiken auf. Den Studienteilnehmern, die an einem metastasierten malignen Melanom litten, wurde *S. typhimurium* intravenös verabreicht. Aufgrund der Fähigkeit von *Salmonella*, sich in Tumorgewebe anzureichern und dessen Wachstum zu inhibieren [107], wurden 24 Patienten intravenös mit einem attenuierten *S. typhimurium*-Stamm behandelt. Zu den unerwünschten Wirkungen dieser Immunisierung gehörten Thrombozytopenie, Anämie, persistierende Bakteriämie, Hyperbilirubinämie, Diarrhö, Erbrechen und Übelkeit. Eine Tumorrogression konnte bei keinem der Patienten beobachtet werden [108].

Gemessen am großen Erfolg von *S. typhimurium* als Vakzin-Vektor im Mausmodell waren die Resultate bei Anwendung dieser Impfstrategie im Rahmen klinischer Studien bisher enttäuschend. Galen und Kollegen berichten über 8 klinische Studien, bei denen *S. typhi* als Vektor für heterologe Antigene eingesetzt wurde [72]. Als gemeinsames Merkmal

dieser klinischen Studien stellte sich heraus, dass *S. typhi*-Vektoren in humanen Immunisierungen im Vergleich zu murinen *S. typhimurium*-Immunisierungen nur schwach immunogen waren [77, 109-115]. Galen und Kollegen sahen die Ursache für dieses Phänomen in einer zu starken Attenuierung der *S. typhi*-Vektoren [72]. Die verwendeten Vektoren waren rekombinant veränderte Typhus-Lebendimpfstoffe. Hieraus resultierte die Hypothese, dass optimal attenuierte Typhus-Impfstoffe als Träger heterologer Antigene bereits zu stark attenuiert sein könnten [72]. Curtiss und Kollegen machen den metabolischen Stress, der bei der Expressierung heterologer Antigene in den Bakterien entsteht, für dieses Phänomen verantwortlich [116, 117]. Diese Autoren fanden zudem Hinweise dafür, dass der Grad der Attenuierung selbst die Immunogenität eines heterologen Salmonellen-Impfstoffes beeinflusst. Die gleichen Virulenzfaktoren, die *Salmonella* befähigen, in den Wirt einzudringen und diesen zu schädigen, wären demnach zugleich für eine starke Immunogenität des Impfstoffes notwendig. Unterstützung für diese These lieferten Experimente mit konditional attenuierten *Salmonella*-Vektoren. Konditionale Attenuierung bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Bakterien bei der Immunisierung theoretisch genauso virulent sind wie Wildtyp-Bakterien. Sobald die Salmonellen den Wirt kolonisieren und lymphatische Gewebe erreicht haben, manifestiert sich die Attenuierung. Bei Studien mit konditional attenuierten *Salmonella*-Vektoren, die ein heterologes Antigen des Bakteriums *Streptococcus pneumoniae* trugen, konnte eine vielfach stärkere Immunantwort als bei klassisch attenuierten Vektoren beobachtet werden [116, 117].

Neben einer weiteren Verbesserung der Balance zwischen Attenuierung und Virulenz von *Salmonella*-Impfstämmen könnte auch eine externe Kontrolle der Kolonisierungsdauer zu mehr Sicherheit beitragen. Hierdurch könnte beispielsweise die Gefahr einer chronischen Persistenz des Vektors oder der Ausbreitung des Impfstammes auf Kontaktpersonen des Impflings wesentlich verringert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, wie lange ein *Salmonella*-Impfvektor auf dem natürlichen Immunisierungsweg kolonisieren muss, bis die Impfvaktormenge durch eine Antibiotikagabe reduziert werden kann, ohne hierdurch die Induktion einer schützenden Population antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen zu verhindern.

4.2. Einfluss der Kolonisierungskinetik auf die Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen

4.2.1. Vektorreduktion durch Ciprofloxacin

Um diese Frage zu beantworten, wurden Mäuse, wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, oral mit dem Stamm SB824 (pHR241) immunisiert. Die Vektormenge wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung durch Verabreichung des Antibiotikums Ciprofloxacin stark reduziert. Ciprofloxacin wurde aufgrund von klinischen Empfehlungen zur Behandlung des *Typhus abdominalis* ausgewählt [118]. Darauffolgend wurde der Einfluss dieser veränderten Kolonisierungskinetik auf die Menge und Funktionalität der induzierten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen analysiert (siehe Abb. 14).

In den ersten Versuchsreihen wurde die Wirksamkeit von Ciprofloxacin auf den Stamm SB824 (pHR241) getestet. Testreihen *in vitro* ergaben eine MBC von 1 µg/ml, die vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien und den Herstellerangaben war [118]. Daraufhin wurden *in vivo* Experimente zur Applikationsart des Antibiotikums (Kapitel 3.2.2) durchgeführt. Hierbei wurde die intravenöse und intraperitoneale Applikation untersucht. Zusätzlich wurde das Ciprofloxacin immer auch oral verabreicht. Anfangs zeigte sich nur eine schwache Wirksamkeit des Ciprofloxacins. Als Ursache für dieses Phänomen wurde eine zu hohe Konzentration des Antibiotikums vermutet. Bei der intravenösen und intraperitonealen Applikation war das Ciprofloxacin bei den ersten Versuchen mit 10 mg/ml H₂O_{dest} sehr hoch konzentriert. Webb und Kollegen berichten, dass Ciprofloxacin in hoher Konzentration (> 2 mg/ml H₂O_{dest}) im Gewebe schnell auskristallisiert und somit unwirksam wird [89]. Daher wurde die Konzentration der Ciprofloxacinlösung für die intraperitoneale Applikation auf 2 mg/ml abgesenkt. Hierdurch konnte durch eine niedrigere Konzentration eine höhere Wirksamkeit erreicht werden. Die intravenöse Applikation wurde aus zwei Gründen nicht weiter durchgeführt: der Vergleich zwischen intraperitonealer und intravenöser Verabreichung zeigte zwar keinen signifikanten Unterschied, tendenziell war aber die Effektivität der intraperitonealen Applikation höher (siehe Abb. 9). Der zweite Grund bestand in technischen Schwierigkeiten bei mehrfacher Injektion des Ciprofloxacins in die Schwanzvene der Mäuse. Für die folgenden Versuche wurde daher die kombinierte intraperitoneale und orale Applikation des Ciprofloxacins gewählt.

Das Antibiotikum wurde im Abstand von 12 Stunden über einen Zeitraum von 4 Tagen verabreicht. Über die optimale Behandlungsdauer mit Fluorchinolonen bei *Typhus*

abdominalis besteht Uneinigkeit. Zwar wird eine Behandlungsdauer von 10-14 Tagen empfohlen, neuere Studien ergaben aber, dass eine zwei- oder dreitägige Behandlung ausreichend ist [118-121]. Laut Thaver und Kollegen ist eine Kurzzeit-Behandlung aufgrund niedrigerer Kosten, geringerer Nebenwirkungen und einer besseren Compliance der Langzeitbehandlung vorzuziehen [118]. Eine 2011 veröffentlichte Studie von Crull und Weiss über die Wirkung von Ciprofloxacin in einem *S. typhimurium* Maus-Immunisierungsmodell konnte ebenfalls eine gute Ciprofloxacinwirkung bei einer viertägigen Behandlung nachweisen [122]. In der hier vorliegenden Studie wurde deshalb, auch im Hinblick auf eine mögliche Übertragung auf klinische Studien, das Ciprofloxacin nur für 4 Tage verabreicht.

In den darauffolgenden Versuchen zur Ciprofloxacinwirkung (Kapitel 3.2.3) konnte dann eine deutliche Reduktion des *Salmonella*-Impfvectors sowohl in Stuhlproben als auch in Zökum- und Milzausstrichen nachgewiesen werden. In Stuhlproben konnte die Menge der Salmonellen um mehr als 5 Log-Stufen, im Zökum um mehr als 3 Log-Stufen und in der Milz um mehr als 1 Log-Stufe verringert werden. Zu berücksichtigen ist, dass durch die Antibiotikagabe eine zügige und starke Verminderung der Menge des Impfvectors erreicht wurde, jedoch keine vollständige Eradikation desselben.

4.2.2. Alternative Methoden zur Vektorreduktion

Der umfangreiche und teilweise unkontrollierte Einsatz von Antibiotika hat weltweit zur Ausbreitung vielfach resistenter Bakterienstämme geführt. Hierzu gehören grampositive Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und Enterokokken, ebenso wie multiresistente *Mycobacterium tuberculosis*- oder *S. typhi*-Stämme [123-125]. Erkrankungen durch multiresistente *S. typhi*-Stämme („multi drug resistant typhoid fever“, MDRTF) sind durch Resistenzen des Erregers gegenüber den 3 ursprünglichen Antibiotika der ersten Wahl bei *Typhus abdominalis* charakterisiert. Diese 3 Antibiotika waren Chloramphenicol, Ampicillin und Cotrimoxazol. Gegen Chloramphenicol resistente *S. typhi* wurden bereits im Jahr 1950, nur 2 Jahre nach der Einführung dieses Antibiotikums, entdeckt. In den darauffolgenden Jahren traten ebenfalls Resistenzen gegen Ampicillin und Cotrimoxazol auf. Heute wird die Inzidenz von MDRTF in einigen asiatischen Ländern auf bis zu 65 % beziffert [126]. Auch gegenüber Ciprofloxacin, dem aktuellen Standardmedikament bei *Typhus abdominalis*, werden bei *S. typhi*-Stämmen immer mehr Resistenzen entdeckt [127, 128].

Für eine mögliche Übertragung der hier vorgestellten Vektorreduktion auf eine klinische Anwendung wäre daher eine alternative Methode zur Verringerung der Impfvektor-Menge wünschenswert.

Loessner und Kollegen entwickelten eine Methode, die eine externe Steuerung rekombinant veränderter Salmonellen durch Verabreichung des Zuckers L-Arabinose erlaubt. Sie wiesen anhand rekombinanter Salmonellen nach, dass heterologe Gene, die unter Kontrolle des Promoters P_{BAD} stehen, durch L-Arabinose *in vivo* aktivierbar sind [129]. Stand das „lysin gene E“ des Bakteriophagen $\phi X174$ unter Kontrolle des P_{BAD} Promoters, konnte durch Verabreichung von L-Arabinose eine Lyse der Bakterien *in vivo* induziert werden [129]. Diese Methode der Vektorreduktion stellt eine aussichtsreiche Alternative zur Verabreichung von Antibiotika dar.

4.2.3. Einfluss der Vektorreduktion auf die Induktion p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Nach der Etablierung der Antibiotikagabe als geeignete Methode zur Impfvektorreduktion wurde deren Einfluss auf die Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen analysiert. Hierzu wurden, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, die Versuchsgruppen 15-18 miteinander verglichen. Wurde die Antibiotikagabe im direkten Anschluss an die Immunisierung begonnen (Versuchsgruppe 16), so wurde eine signifikant geringere Menge p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen induziert.

Wurde die Antibiotikagabe hingegen erst am Tag 2 nach der Immunisierung begonnen (Versuchsgruppe 17), so war die Menge der induzierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Versuchsgruppe 15) nicht signifikant verringert. Wie im Folgenden noch diskutiert wird, waren die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen der Versuchsgruppe 17 auch in ihrer biologischen Funktionalität im Vergleich zur Positivkontrollgruppe nicht limitiert. Gleiches gilt für die Gruppe, in der das Ciprofloxacin ab dem 4. Tag nach der Immunisierung verabreicht wurde (Versuchsgruppe 18). Weder Menge noch Funktion der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen unterschieden sich von denen der Kontrollgruppe (siehe Abb. 15).

Neben der Betrachtung der Menge induzierter p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurde auch die Funktionalität dieser Zellpopulation genauer untersucht. Wie in Kapitel 3.4 beschrieben wurde, kann die Funktionalität der im Rahmen dieser Arbeit induzierten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen durch die Analyse der T-Zell-Subpopulationen oder durch

Belastungsinfektionen mit dem mauspathogenen Bakterium *L. monocytogenes* überprüft werden. Im Rahmen der Untersuchung der T-Zell-Subpopulationen wurde insbesondere auf den Anteil der T_{EMC} geachtet. Diese Zellpopulation vermittelt den Schutz im Rahmen einer Belastungsinfektion mit *L. monocytogenes* (siehe Kapitel 3.4.2) [130]. Bei Mäusen der Positivkontrollgruppe (Versuchsgruppe 15) bildeten die T_{EMC} mit einem Anteil von 48 % die größte Untergruppe der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Die Mäuse der Versuchsgruppe 18 (Ciprofloxacingabe ab Tag 4) wiesen eine Verteilung der T-Zell-Subpopulationen auf, die nicht signifikant von der Verteilung der Positivkontrolle (Versuchsgruppe 15) abwich. Interessanterweise wiesen die Mäuse der Versuchsgruppe 17 (Ciprofloxacingabe ab Tag 2) im Vergleich mit der Positivkontrolle (Versuchsgruppe 15) zwar keine signifikant niedrigere Menge p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen auf, in der Verteilung der T-Zell-Subpopulationen konnte jedoch ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Mäuse der Versuchsgruppe 17 (Ciprofloxacingabe ab Tag 2) wiesen mit 37 % T_{EMC} einen signifikant geringeren Anteil dieser Subpopulation der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf. Die T_{EC} waren dagegen bei Versuchsgruppe 17 (Ciprofloxacingabe ab Tag 2) mit einem Anteil von 53 % gegenüber einem Anteil von 41 % bei Versuchsgruppe 15 (Positivkontrollgruppe) signifikant erhöht.

Darauffolgend wurden Belastungsinfektionen mit *L. monocytogenes* durchgeführt (Kapitel 3.4.3). Im Einklang mit Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe waren die Mäuse der Versuchsgruppe 15 (Positivkontrollgruppe) sehr gut vor einer Listerien-Infektion geschützt. Des Weiteren stellte sich heraus, dass Mäuse der Versuchsgruppe 16 (Ciprofloxacingabe ab Tag 0) nicht geschützt waren. Dieses Ergebnis entsprach der Beobachtung, dass in dieser Versuchsgruppe nur eine geringe Menge p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen induziert werden konnte. Obwohl die Aufteilung der T-Zell-Subpopulationen in Versuchsgruppe 17 (Ciprofloxacingabe ab Tag 2) einen signifikanten Unterschied zur Aufteilung der Versuchsgruppe 15 (Positivkontrollgruppe) aufwies, zeigte sich bei den Belastungsinfektionen mit *Listeria* kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen.

Diese Untersuchungen liefern somit neue Erkenntnisse, die zur Beantwortung zweier bedeutsamer Fragen beitragen können.

1. Wie lange muss der antigenträgende Impfvektor im Körper der Maus verbleiben, damit die CD8⁺T-Zellen ausreichend reifen und expandieren können?
2. Wo findet die Generierung der in der Milz detektierten antigenspezifischen CD8⁺T-Zellen statt?

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bereits 2 Tage nach der Immunisierung eine hochgradige Vektorreduktion initiiert werden kann. Diese frühe Vektorreduktion beeinträchtigt die Induktion p60-spezifischer CD8⁺T-Zellen nicht. Van Stipdonk und Kollegen beschrieben, dass bereits eine zweistündige Stimulation durch APC ausreicht, um eine weitere antigenunabhängige Reifung naiver CD8⁺T-Zellen zu bewirken [131]. Dies wird durch eine Studie von Kaech und Kollegen untermauert [132]. Diese demonstrierten, dass einmal aktivierte T-Zellen antigenunabhängig mindestens 7 Teilungen durchführen und sich weiter zu Effektor- und Gedächtniszellen differenzieren können [133]. In Immunisierungsexperimenten mit *L. monocytogenes* konnten Mercado und Kollegen herausarbeiten, dass die Generierung antigenspezifischer CD8⁺T-Zellen bereits innerhalb der ersten 24 Stunden initiiert wird [134]. Die Kolonisierung der Mäuse mit Listerien wurde 24 Stunden nach oraler Immunisierung durch eine Ampicillingabe abgebrochen. Analog zu unseren Studien untersuchten Mercado und Kollegen die Generierung p60-spezifischer CD8⁺T-Zellen. Mercado und Kollegen vermuteten, dass einmal aktivierte T-Zellen antigenunabhängig weiterreifen und expandieren. Als alternative Erklärung diskutierten sie, dass APC auch nach einer Antibiotikagabe weiterhin geringe Mengen des Antigens präsentieren. Hierdurch könnten T-Zellen weiterhin stimuliert werden. Ebenso wird vermutet, dass die Antigene in einem Depot für längere Zeit verweilen könnten [135].

In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die Mechanismen der Immunsystem-Aktivierung zwischen Listerien und Salmonellen diverse Unterschiede aufweisen. Eine hohe Relevanz besitzt dabei die unterschiedliche Lokalisation der beiden Bakterien innerhalb der Körperzelle. Während Salmonellen in der SCV verweilen, können Listerien im Zytoplasma überleben [31, 136, 137]. Die in dieser Arbeit angewandte Translokation des p60-Antigens mittels des T3SS könnte diesen Unterschied jedoch relativieren. *L. monocytogenes* dient seit vielen Jahren als Modellerreger zur Erforschung von Infektionen mit intrazellulär replizierenden Erregern und trug maßgeblich zum

Verständnis der zellvermittelten Immunität bei [138]. Im Mausmodell wurde *Listeria* jedoch überwiegend intravenös verabreicht. Orale Immunisierungen von Mäusen sind aufgrund einer einzelnen veränderten Aminosäure des murinen E-Cadherin-Gens ineffektiv [139]. Es ist daher bemerkenswert, dass im Mausmodell mithilfe der hier vorgestellten Salmonellen-Immunisierung auf dem natürlichen Immunisierungsweg *Listerias* eine adaptive Immunantwort gegen Listerien-Proteine induziert werden kann.

Um die Frage nach dem Ort der T-Zell-Induktion zu klären, ist eine genauere Betrachtung der frühen Mechanismen während einer Salmonelleninfektion erforderlich. Zur Entstehung der Immunantwort und Immunität als Reaktion auf lebende *Salmonella*-Impfstoffe oder Salmonelleninfektionen existiert eine Vielzahl von Studien [37, 140, 141]. Diese beziehen sich jedoch auf die spezielle Art der Vermehrung der Salmonellen in der SCV. Zur Art der Prozessierung von Salmonellen-Proteinen, die über das T3SS in das Zytoplasma der APC befördert wurden, liegen bisher nur sehr wenige Studien vor.

Salmonellen gelangen hauptsächlich über die M-Zellen der PP aus dem Darmlumen in die Darmschleimhaut [39, 40, 140]. Weitere Mechanismen wurden bereits einleitend beschrieben und werden in Abb. 20 zusammenfassend visualisiert. Ein weiterer Eintrittsmechanismus ist das Überwinden der Epithelbarriere mithilfe von DCs. Diese nehmen die Salmonellen direkt aus dem Darmlumen auf [142-144]. Dieser Vorgang scheint jedoch vor allem für nicht-invasive bakterielle Krankheitserreger relevant zu sein und nimmt folglich für invasive Salmonellen eine nur geringe Rolle ein [145].

Unumstritten hingegen ist, dass intestinale DCs die wichtigsten Zellen zur lokalen Antigenpräsentation an T-Zellen darstellen [146-149]. Das Priming der T-Zellen kann in mesenterialen Lymphknoten (MLN) und in PP stattfinden [140], siehe dazu auch Abb. 20. Salazar-Gonzalez und Kollegen berichten über eine DC-Untergruppe, die den Rezeptor CCR6 trägt. CCR6 ist der Rezeptor für das Chemokin CCL20 [146]. Die CCR6-positiven (CCR6+) DCs spielen eine entscheidende Rolle beim frühen T-Zell-Priming in PP. Salazar und Kollegen untersuchten den Einfluss der CCR6+ DCs auf die Induktion von CD4⁺ T-Zellen. Untersuchungen von Le Borgne und Kollegen zur Folge spielen CCR6+ DCs jedoch ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen [150]. Eine weitere Untergruppe von DCs, die CX₃CR1-positiven DCs, können Antigene in der Lamina propria und in PP aufnehmen und diese in die lokalen MLN transportieren [142-145]. Dort werden die Antigene den T-Zellen präsentiert. Uneinigkeit besteht darüber, ob die CX₃CR1-

positiven DCs auch Antigene, die sie aus dem Darmlumen aufgenommen haben, in die MLN befördern [151, 152].

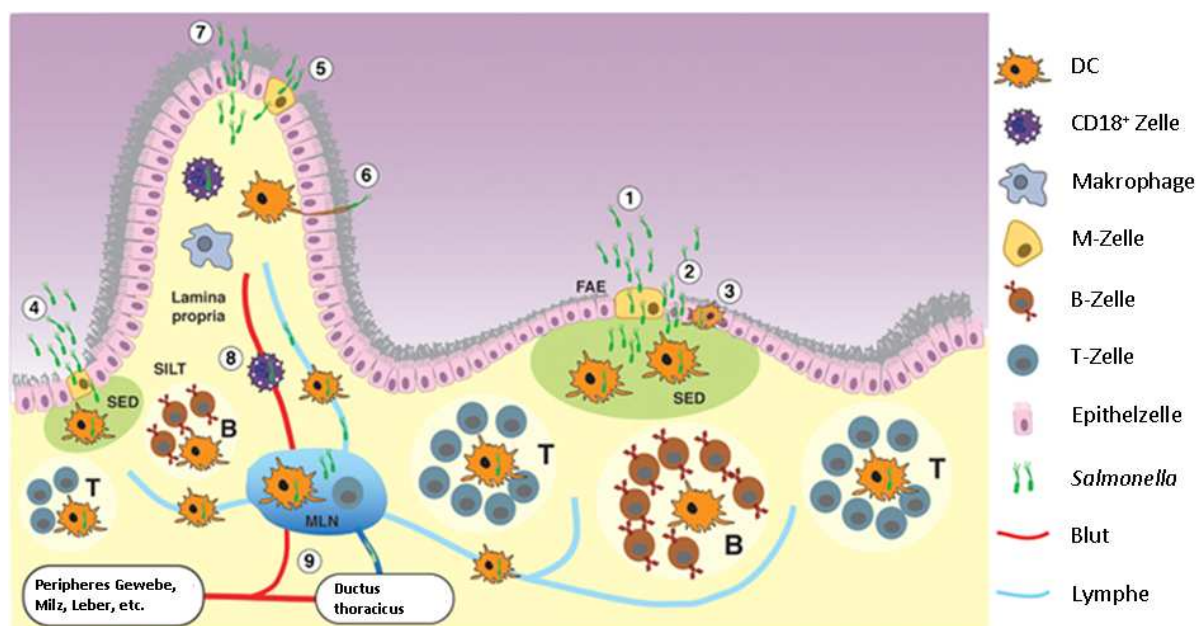


Abbildung 20 Eintritt und Aufnahme von Salmonellen nach oraler Immunisierung. Salmonella kann das Darmepithel über verschiedene Eintrittspforten überwinden. Am häufigsten geschieht dies im distalen Ileum. Zwei dieser Eintrittspforten sind lymphatische Gewebe wie die PP und das solitäre intestinale lymphatische Gewebe („solitary intestinal lymphoid tissue“, SILT). Die verschiedenen Eintrittsmechanismen sind hier mit Nummern versehen. In PP können Salmonellen die epitheliale Barriere durch M-Zellen (1) oder Epithelzellen (2) überwinden. Im follikel-assoziierten Epithel (FAE) befinden sich DCs, die ebenfalls Salmonellen aufnehmen können (3). Salmonellen, die das Epithel einmal durchdrungen haben, können von DCs im sub-epithelialen Dom (SED) aufgenommen werden. DCs, die Salmonellen aufgenommen haben, können dann direkt T-Zellen stimulieren (T) oder in mesenteriale Lymphknoten (MLN) wandern um dort eine adaptive Immunantwort zu initiieren. Zusätzlich können Salmonellen über das SILT, möglicherweise ähnlich wie in PP, das Darmepithel durchdringen (4). Der Eintritt Salmonellas in die Darmzotten geschieht in Form einer Durchwanderung von M-Zellen (5), mithilfe von DCs, welche Salmonellen direkt aus dem Darmlumen aufnehmen (6), oder mittels Durchwanderung von Epithelzellen oder deren Zwischenräumen (7). Sobald die Salmonellen die Lamina propria erreicht haben, werden sie von wandernden DCs zu den MLN transportiert. Es ist außerdem möglich, dass Salmonellen als freie Bakterien zu den MLN gelangen. Ein weiterer Mechanismus der Ausbreitung ist der Transport in CD18+ Phagozyten (8). Salmonellen können die MLN als freie Bakterien oder assoziiert mit anderen Zellen verlassen und sich von dort über die Lymphbahnen oder die Blutbahn in weitere Körpergewebe ausbreiten. Abbildung und Text modifiziert nach [140].

Zusätzlich ist eine Betrachtung der Kolonisierungskinetik *Salmonellas* notwendig. Invasive Salmonellen besiedeln zuerst den Darm, treten dann über M-Zellen in die Lamina Propria und die PP ein, gelangen über die Lymphe in die MLN und breiten sich erst dann systemisch in Organe wie Leber und Milz aus. Diesen Ablauf bestätigen die Erkenntnisse aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe im Einklang mit weiteren Studien. Sevil und Kollegen

haben die Kolonisierungskinetik des in dieser Arbeit verwendeten Salmonellen-Stammes SB824 nach oraler Immunisierung von Mäusen beschrieben. Die Salmonellen waren nach 2 Tagen im Zökum, nach 4 Tagen in den MLN und nach 7 Tagen auch in der Milz nachweisbar [153]. Abweichend zu Sevils Studien konnten in der hier vorliegenden Arbeit schon am Tag 6 Salmonellen in der Milz detektiert werden. Die von Sevil beschriebene Kolonisierungskinetik und die Ergebnisse unserer Arbeit stimmen ebenfalls mit den Berichten von Tam und Kollegen überein [140, 154, 155]. Sie erklären, dass zuerst die PP und MLN kolonisiert werden und daran anschließend die systemische Ausbreitung stattfindet. Die Bakterien verbreiten sich über die Lymphbahnen und über den *Ductus thoracicus* auch in die Blutbahn [156, 157].

Diese Ausführungen lassen zusammenfassend darauf schließen, dass Salmonellen in der frühen Phase nach der Immunisierung nur den Darm besiedeln und dort Interaktionen mit dem mukosalen Immunsystem eingehen. Auch unter Berücksichtigung der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ist es naheliegend, dass die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in MLN und PP induziert werden. Hierdurch ließe sich erklären, dass bereits 2 Tage nach der Immunisierung mit einer Ciprofloxacingabe begonnen werden kann, ohne hierdurch die Induktion einer schützenden Frequenz antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen einzuschränken.

Im Widerspruch zu dieser These stehen die Berichte von Worley und Kollegen. Sie fanden in BALB/c Mäusen eine Gruppe von Phagozyten, die oral aufgenommene Salmonella typhimurium Stamm 14028s innerhalb weniger Minuten in die Blutbahn und somit in systemische Organe befördern können [43, 158, 159]. Die Milz als sekundäres lymphatisches Organ ist folglich ebenfalls als Ort der primären Generierung der von uns detektierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen denkbar; auch unter Berücksichtigung der hier vorgestellten Vektorreduktion am Tag 2 nach der Immunisierung.

T-Zellen, die im Darm induziert werden, tragen die Oberflächenrezeptoren CCR9 und $\alpha 4\beta 7$ [160]. Diese werden auch als Homing-Rezeptoren bezeichnet, da sie den T-Zellen die Fähigkeit verleihen, wieder in den Darm zurückzukehren [161, 162]. Um die Frage nach dem Ursprung der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen weiter zu verfolgen, sollten zukünftig weitere Experimente durchgeführt werden. Zusatzfärbungen mit $\alpha 4\beta 7$ oder CCR9 Antikörpern bei FACS-Analysen könnten hierzu einen wichtigen Beitrag leisten.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde eine neuartige Immunisierungsstrategie zur Induktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen verwendet. BALB/c Mäuse wurden oral mit einem attenuierten *S. typhimurium*-Stamm immunisiert. Dieser translozierte unter Verwendung des *Salmonella* Typ III Sekretionssystems das heterologe Antigen p60, ein immunogenes Protein des Bakteriums *Listeria monocytogenes*, direkt in das Zytosol von antigenpräsentierenden Zellen. Aufgrund der intrazellulären Lokalisation wurde p60 über den MHC Klasse I-Antigenpräsentationsweg verarbeitet. Hierdurch konnten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische CD8⁺ T-Zellen induziert werden. Diese vermittelten Schutz vor einer Belastungsinfektion mit *L. monocytogenes*.

Bisher war nicht hinreichend bekannt, wie lange ein lebender Salmonellen-Impfvektor auf dem natürlichen Immunisierungsweg kolonisieren muss, bis die Induktion einer schützenden Frequenz antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen initiiert wird. Daher wurde im Rahmen dieser Studie der Einfluss der Kolonisierungskinetik rekombinanter Salmonellen auf die Induktion p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen untersucht. Hierzu wurden vier Gruppen von BALB/c Mäusen oral mit dem Salmonellen-Stamm SB824 (pHR241) immunisiert. Dieser trägt die genetische Information, um chimäres YopE₁₋₁₃₈/p60₁₃₀₋₄₇₇/M45 unter Expressionskontrolle des *lac* Promotors zu translozieren. Mäuse der ersten Gruppe dienten als Positivkontrolle der Immunisierung. Mäuse der drei weiteren Gruppen wurden mit Beginn an Tag 0, Tag 2 oder Tag 4 über einen Zeitraum von vier Tagen mit dem Fluorchinolon Ciprofloxacin behandelt. Ziel dieser Behandlung war eine Vektorreduktion. Die Wirksamkeit der Antibiotikagabe war zuvor durch mehrere Untersuchungen bestätigt worden.

Am 11. Tag nach der Immunisierung wurden die Milzen aller Mäuse mithilfe der Tetramer-Technologie durchflusszytometrisch auf die Menge p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischer CD8⁺ T-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine Antibiotikagabe bereits am Tag 2 nach der Immunisierung begonnen werden kann, ohne die Menge der induzierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den Mäusen der Positivkontrollgruppe signifikant zu verringern.

Darauffolgend wurden Studien zur Funktionalität der induzierten p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Diese sollten zeigen, ob die Vektorreduktion durch Ciprofloxacin neben der T-Zell-Menge auch die schützende Funktion der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺ T-Zellen beeinflusst. In den oben beschriebenen Gruppen wurden bei den

FACS-Analysen Zusatzfärbungen mit CD62L und CD127 durchgeführt. Hierdurch konnte die Aufteilung der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen CD8⁺T-Zellen in T_{EC} (CD127^{low}/CD62L^{low}), T_{EMC} (CD127^{high}/CD62L^{low}) und T_{CMC} (CD127^{high}/CD62L^{high}) analysiert werden. Die Mäuse der Gruppe, die Ciprofloxacin schon ab Tag 2 erhielten, wiesen im Vergleich mit der Positivkontrollgruppe signifikante Unterschiede in der Verteilung der T-Zell-Subpopulationen auf. Im Rahmen einer Belastungsinfektion mit *L. monocytogenes* waren diese Mäuse jedoch nicht signifikant schlechter geschützt, als Mäuse der immunisierten Kontrollgruppe.

Zusammenfassend konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Antibiotika-Behandlung bereits 2 Tage nach oraler Immunisierung mit einem *S. typhimurium* Impfstoff-Vektor begonnen werden kann, ohne hierdurch die Menge oder Funktionalität der induzierten antigenspezifischen CD8⁺T-Zellen signifikant einzuschränken.

6. Summary

In this study, we used a novel vaccination strategy to induce antigen-specific CD8 T cells. After oral vaccination of BALB/c mice with attenuated *Salmonella typhimurium* the immunodominant p60 antigen from *Listeria monocytogenes* was translocated via the *Salmonella* type III secretion system into the cytosol of antigen-presenting cells. Cytosolic delivery led to efficient MHC class I-restricted antigen presentation of the p60 nonamer peptide p60₂₁₇₋₂₂₅ and the induction of p60₂₁₇₋₂₂₅-specific CD8 T cells. These cells were able to confer protection against a lethal challenge with wild-type *L. monocytogenes*.

To date there has been limited information about how long *Salmonella* live vaccine strains need to colonize on their natural immunization route in order to induce protective antigen-specific CD8 T cells. Therefore, we analyzed the influence of *Salmonella* colonization kinetics on the induction of p60₂₁₇₋₂₂₅-specific CD8 T cells. We orally immunized 4 groups of BALB/c mice with *Salmonella* strain SB824 (pHR241) expressing translocated YopE₁₋₁₃₈/p60₁₃₀₋₄₇₇/M45 under control of the *lac* promoter. Mice of the first immunization group served as positive control of the immunization. Mice of the remaining groups received antibiotic treatment with the fluorquinolone ciprofloxacin from day 0, day 2 or day 4 over a period of 4 days. The efficiency of vector reduction due to antibiotic treatment has been demonstrated before.

Spleens of immunized mice were harvested on day 11 and analyzed for the frequency of p60₂₁₇₋₂₂₅-specific CD8 T cells using tetramer technology in flow cytometry. Analysis showed that the antibiotic treatment could be initiated as soon as 2 days after immunization without significant impairment of p60₂₁₇₋₂₂₅-specific CD8 T cell induction compared to the positive control immunization group.

In a next set of experiments, we investigated the biological functionality of the induced p60₂₁₇₋₂₂₅-specific CD8 T cells. We were interested whether the vector reduction due to antibiotic treatment influences not only the quantity but also the protective capacity of p60₂₁₇₋₂₂₅-specific CD8 T cells. Costaining of tetramer-positive p60₂₁₇₋₂₂₅-specific CD8 T cells with CD62L and CD127 has been performed in the above described groups. This allowed distinguishing between T_{EC} (CD127^{low}/CD62L^{low}), T_{EMC} (CD127^{high}/CD62L^{low}) and T_{CMC} (CD127^{high}/CD62L^{high}). Mice receiving antibiotic treatment from day 2 revealed significant differences in the distribution of CD8 T cell subpopulations compared to the positive control group. Interestingly, after a lethal challenge infection with *L. monocytogenes* no significant

difference in the protection rate of mice treated with ciprofloxacin from day 2 compared with the positive control group could be detected.

In summary, we were able to show that antibiotic treatment of mice orally immunized with a *S. typhimurium* vaccine vector can be initiated as soon as 2 days after immunization without significantly impairing the quantity or functionality of the induced antigen-specific CD8 T cells.

7. Literaturverzeichnis

1. Galan, J.E., *Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work*. Annu.Rev.Cell Dev.Biol., 2001. **17**: p. 53-86.
2. Plotkin, S.A., W.A. Orenstein, and P.A. Offit, *Vaccines*. 5th ed. 2008, Philadelphia, Pa.: Saunders/Elsevier. xvii, 1725 p.
3. Pulendran, B. and R. Ahmed, *Immunological mechanisms of vaccination*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 509-17.
4. Sallusto, F., et al., *From vaccines to memory and back*. Immunity, 2010. **33**(4): p. 451-63.
5. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. Science, 1996. **272**(5258): p. 54-60.
6. Murphy, K.P., et al., *Janeway's immunobiology*. 7th ed. 2008, New York: Garland Science. xxi, 887 p.
7. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
8. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 108-17.
9. Plotkin, S.A., *Immunologic correlates of protection induced by vaccination*. Pediatr.Infect.Dis.J., 2001. **20**(1): p. 63-75.
10. Plotkin, S.A., *Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(3): p. 401-9.
11. Pantaleo, G. and R.A. Koup, *Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 806-10.
12. Hoft, D.F., *Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation*. Lancet, 2008. **372**(9633): p. 164-75.
13. Reyes-Sandoval, A., et al., *Potency assays for novel T-cell-inducing vaccines against malaria*. Curr Opin Mol Ther, 2009. **11**(1): p. 72-80.
14. Sepulveda, N., C.D. Paulino, and J. Carneiro, *Estimation of T-cell repertoire diversity and clonal size distribution by Poisson abundance models*. J.Immunol.Methods, 2010. **353**(1-2): p. 124-137.
15. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 975-1028.

16. Loureiro, J. and H.L. Ploegh, *Antigen presentation and the ubiquitin-proteasome system in host-pathogen interactions*. Adv.Immunol., 2006. **92**: p. 225-305.
17. Moser, M. and O. Leo, *Key concepts in immunology*. Vaccine, 2010. **28 Suppl 3**: p. C2-13.
18. Watts, C., *Antigen processing in the endocytic compartment*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 26-31.
19. Berchtold, C., *Development of a novel vaccination strategy using recombinant Salmonella strains and CpG oligonucleotides*. 2011.
20. Bryant, P. and H. Ploegh, *Class II MHC peptide loading by the professionals*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 96-102.
21. Robinson, J.H. and A.A. Delvig, *Diversity in MHC class II antigen presentation*. Immunology, 2002. **105**(3): p. 252-62.
22. Joffre, O., et al., *Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity*. Immunol.Rev., 2009. **227**(1): p. 234-247.
23. *Correction: The Immune System (First of Two Parts)*. N Engl J Med, 2000. **343**(15): p. 1132.
24. Vigneron, N. and B.J. Van den Eynde, *Insights into the processing of MHC class I ligands gained from the study of human tumor epitopes*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(9): p. 1503-20.
25. Abele, R. and R. Tampe, *The TAP translocation machinery in adaptive immunity and viral escape mechanisms*. Essays Biochem, 2011. **50**(1): p. 249-64.
26. Rock, K.L., et al., *Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides*. Adv.Immunol., 2002. **80**: p. 1-70.
27. Inaba, K. and M. Inaba, *Antigen recognition and presentation by dendritic cells*. Int J Hematol, 2005. **81**(3): p. 181-7.
28. Cerottini, J.C., A.A. Nordin, and K.T. Brunner, *Specific in vitro cytotoxicity of thymus-derived lymphocytes sensitized to alloantigens*. Nature, 1970. **228**(5278): p. 1308-1309.
29. Robinson, H.L. and R.R. Amara, *T cell vaccines for microbial infections*. Nat Med, 2005. **11**(4 Suppl): p. S25-32.
30. Zhang, X.L., V.T. Jeza, and Q. Pan, *Salmonella typhi: from a human pathogen to a vaccine vector*. Cell Mol Immunol, 2008. **5**(2): p. 91-7.
31. Paterson, Y., P.D. Guirnalda, and L.M. Wood, *Listeria and Salmonella bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy*. Semin Immunol, 2010. **22**(3): p. 183-9.

-
32. McClelland, M., et al., *Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*. Nature, 2001. **413**(6858): p. 852-856.
 33. Crump, J.A. and E.D. Mintz, *Global trends in typhoid and paratyphoid Fever*. Clin Infect Dis, 2010. **50**(2): p. 241-6.
 34. Andrews-Polymenis, H.L., et al., *Taming the elephant: Salmonella biology, pathogenesis, and prevention*. Infect.Immun., 2010. **78**(6): p. 2356-2369.
 35. Herikstad, H., Y. Motarjemi, and R.V. Tauxe, *Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping*. Epidemiol.Infect., 2002. **129**(1): p. 1-8.
 36. Bolhassani, A., S. Safaiyan, and S. Rafati, *Improvement of different vaccine delivery systems for cancer therapy*. Mol.Cancer, 2011. **10**: p. 3.
 37. Biedzka-Sarek, M. and M. El Skurnik, *How to outwit the enemy: dendritic cells face Salmonella*. APMIS, 2006. **114**(9): p. 589-600.
 38. Jang, M.H., et al., *Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2004. **101**(16): p. 6110-6115.
 39. Jepson, M.A. and M.A. Clark, *The role of M cells in Salmonella infection*. Microbes.Infect., 2001. **3**(14-15): p. 1183-1190.
 40. Jones, B.D., N. Ghorri, and S. Falkow, *Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches*. J.Exp.Med., 1994. **180**(1): p. 15-23.
 41. Rescigno, M., et al., *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. Nat.Immunol., 2001. **2**(4): p. 361-367.
 42. Finlay, B.B. and S. Falkow, *Salmonella interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells*. J.Infect.Dis., 1990. **162**(5): p. 1096-1106.
 43. Vazquez-Torres, A., et al., *Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes*. Nature, 1999. **401**(6755): p. 804-808.
 44. Galan, J.E. and A. Collmer, *Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1322-8.
 45. Ehrbar, K., B. Winnen, and W.D. Hardt, *The chaperone binding domain of SopE inhibits transport via flagellar and SPI-1 TTSS in the absence of InvB*. Mol Microbiol, 2006. **59**(1): p. 248-64.
 46. Galan, J.E. and H. Wolf-Watz, *Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines*. Nature, 2006. **444**(7119): p. 567-73.
 47. Agbor, T.A. and B.A. McCormick, *Salmonella effectors: important players modulating host cell function during infection*. Cell Microbiol, 2011. **13**(12): p. 1858-69.

48. Patel, J.C. and J.E. Galan, *Manipulation of the host actin cytoskeleton by Salmonella--all in the name of entry*. Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(1): p. 10-5.
49. Bakshi, C.S., et al., *Identification of SopE2, a Salmonella secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells*. J Bacteriol, 2000. **182**(8): p. 2341-4.
50. Friebel, A., et al., *SopE and SopE2 from Salmonella typhimurium activate different sets of RhoGTPases of the host cell*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 34035-40.
51. Meinel, K.M., *Charakterisierung antigenspezifischer CD8+ T-Zellsubpopulationen nach oraler Immunisierung mit rekombinanten Salmonella typhimurium-Impfstämmen*. 2007.
52. Fu, Y. and J.E. Galan, *The Salmonella typhimurium tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton*. Mol Microbiol, 1998. **27**(2): p. 359-68.
53. Russmann, H., et al., *Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development*. Science, 1998. **281**(5376): p. 565-568.
54. Viboud, G.I. and J.B. Bliska, *Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis*. Annu.Rev.Microbiol, 2005. **59**: p. 69-89.
55. Rosqvist, R., et al., *Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of yersiniae, salmonellae and shigellae*. EMBO J., 1995. **14**(17): p. 4187-4195.
56. Hoiseth, S.K. and B.A. Stocker, *Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines*. Nature, 1981. **291**(5812): p. 238-239.
57. Russmann, H., et al., *Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant Salmonella expressing hybrid Yersinia type III proteins*. J.Immunol., 2001. **167**(1): p. 357-365.
58. Allerberger, F. and M. Wagner, *Listeriosis: a resurgent foodborne infection*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(1): p. 16-23.
59. Freitag, N.E., G.C. Port, and M.D. Miner, *Listeria monocytogenes - from saprophyte to intracellular pathogen*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(9): p. 623-8.
60. Schnupf, P. and D.A. Portnoy, *Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin*. Microbes Infect, 2007. **9**(10): p. 1176-87.
61. Tilney, L.G. and D.A. Portnoy, *Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes*. J Cell Biol, 1989. **109**(4 Pt 1): p. 1597-608.
62. Shahabi, V., et al., *Live, attenuated strains of Listeria and Salmonella as vaccine vectors in cancer treatment*. Bioeng Bugs, 2010. **1**(4): p. 235-43.

-
63. Faith, N.G., et al., *A P60 mutant of Listeria monocytogenes is impaired in its ability to cause infection in intragastrically inoculated mice*. *Microb Pathog*, 2007. **42**(5-6): p. 237-41.
 64. Park, J.H., et al., *Specific binding of recombinant Listeria monocytogenes p60 protein to Caco-2 cells*. *FEMS Microbiol Lett*, 2000. **186**(1): p. 35-40.
 65. Kuhn, M. and W. Goebel, *Identification of an extracellular protein of Listeria monocytogenes possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells*. *Infect Immun*, 1989. **57**(1): p. 55-61.
 66. Finelli, A., et al., *MHC class I restricted T cell responses to Listeria monocytogenes, an intracellular bacterial pathogen*. *Immunol Res*, 1999. **19**(2-3): p. 211-23.
 67. Busch, D.H. and E.G. Pamer, *MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL*. *J Immunol*, 1998. **160**(9): p. 4441-8.
 68. Harty, J.T. and E.G. Pamer, *CD8 T lymphocytes specific for the secreted p60 antigen protect against Listeria monocytogenes infection*. *J Immunol*, 1995. **154**(9): p. 4642-50.
 69. Neutra, M.R. and P.A. Kozlowski, *Mucosal vaccines: the promise and the challenge*. *Nat.Rev.Immunol.*, 2006. **6**(2): p. 148-158.
 70. Kochi, S.K., K.P. Killeen, and U.S. Ryan, *Advances in the development of bacterial vector technology*. *Expert Rev Vaccines*, 2003. **2**(1): p. 31-43.
 71. Pasetti, M.F., et al., *Immunology of gut mucosal vaccines*. *Immunol Rev*, 2011. **239**(1): p. 125-48.
 72. Galen, J.E., et al., *Salmonella enterica serovar Typhi live vector vaccines finally come of age*. *Immunol.Cell Biol.*, 2009. **87**(5): p. 400-412.
 73. Kotton, C.N. and E.L. Hohmann, *Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery*. *Infect Immun*, 2004. **72**(10): p. 5535-47.
 74. Whittle, B.L. and N.K. Verma, *The immune response to a B-cell epitope delivered by Salmonella is enhanced by prior immunological experience*. *Vaccine*, 1997. **15**(16): p. 1737-40.
 75. Levine, M.M., D.N. Taylor, and C. Ferreccio, *Typhoid vaccines come of age*. *Pediatr Infect Dis J*, 1989. **8**(6): p. 374-81.
 76. Levine, M.M., et al., *Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation*. *Lancet*, 1987. **1**(8541): p. 1049-52.
 77. DiPetrillo, M.D., et al., *Safety and immunogenicity of phoP/phoQ-deleted Salmonella typhi expressing Helicobacter pylori urease in adult volunteers*. *Vaccine*, 1999. **18**(5-6): p. 449-59.

78. Tacket, C.O., et al., *Clinical acceptability and immunogenicity of CVD 908 Salmonella typhi vaccine strain*. *Vaccine*, 1992. **10**(7): p. 443-6.
79. Panthel, K., et al., *Salmonella type III-mediated heterologous antigen delivery: a versatile oral vaccination strategy to induce cellular immunity against infectious agents and tumors*. *Int.J.Med.Microbiol.*, 2008. **298**(1-2): p. 99-103.
80. Effa, E.E., et al., *Fluoroquinolones for treating typhoid and paratyphoid fever (enteric fever)*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011(10): p. CD004530.
81. Easmon, C.S. and A. Blowers, *Ciprofloxacin treatment of systemic salmonella infection in sensitive and resistance mice*. *J.Antimicrob.Chemother.*, 1985. **16**(5): p. 615-619.
82. Kaniga, K., et al., *A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen Salmonella typhimurium 2*. *Mol.Microbiol.*, 1996. **21**(3): p. 633-641.
83. Bishop, D.K. and D.J. Hinrichs, *Adoptive transfer of immunity to Listeria monocytogenes. The influence of in vitro stimulation on lymphocyte subset requirements*. *J.Immunol.*, 1987. **139**(6): p. 2005-2009.
84. Jameson, S.C., *Maintaining the norm: T-cell homeostasis*. *Nat.Rev.Immunol.*, 2002. **2**(8): p. 547-556.
85. Busch, D.H., et al., *Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection*. *Immunity.*, 1998. **8**(3): p. 353-362.
86. Busch, D.H. and E.G. Pamer, *T cell affinity maturation by selective expansion during infection*. *J.Exp.Med.*, 1999. **189**(4): p. 701-710.
87. Barthel, M., et al., *Pretreatment of mice with streptomycin provides a Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host*. *Infect Immun*, 2003. **71**(5): p. 2839-58.
88. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S33-S40.
89. Webb, M.S., et al., *Antibacterial efficacy against an in vivo Salmonella typhimurium infection model and pharmacokinetics of a liposomal ciprofloxacin formulation*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**(1): p. 45-52.
90. Sevil, D.V., et al., *Heterologous prime-boost immunizations with different Salmonella serovars for enhanced antigen-specific CD8 T-cell induction*. *Vaccine*, 2008. **26**(15): p. 1879-1886.
91. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. *Nature*, 1999. **401**(6754): p. 708-712.

-
92. Huster, K.M., et al., *Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells*. Eur.J.Immunol., 2006. **36**(6): p. 1453-1464.
 93. Bachmann, M.F., et al., *Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4686-96.
 94. Gunn, M.D., et al., *A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 258-63.
 95. Obar, J.J. and L. Lefrancois, *Memory CD8+ T cell differentiation*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1183**: p. 251-66.
 96. Barbuddhe, S.B. and T. Chakraborty, *Listeria as an enteroinvasive gastrointestinal pathogen*. Curr Top.Microbiol Immunol., 2009. **337**: p. 173-195.
 97. Excler, J.L. and S. Plotkin, *The prime-boost concept applied to HIV preventive vaccines*. AIDS, 1997. **11 Suppl A**: p. S127-37.
 98. Radosevic, K., et al., *Heterologous prime-boost vaccinations for poverty-related diseases: advantages and future prospects*. Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(5): p. 577-92.
 99. Formal, S.B., et al., *Construction of a potential bivalent vaccine strain: introduction of Shigella sonnei form I antigen genes into the galE Salmonella typhi Ty21a typhoid vaccine strain*. Infect Immun, 1981. **34**(3): p. 746-50.
 100. Panthel, K., et al., *Prophylactic anti-tumor immunity against a murine fibrosarcoma triggered by the Salmonella type III secretion system*. Microbes.Infect., 2006. **8**(9-10): p. 2539-2546.
 101. Nishikawa, H., et al., *In vivo antigen delivery by a Salmonella typhimurium type III secretion system for therapeutic cancer vaccines*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1946-54.
 102. Nishikawa, H., et al., *Induction of regulatory T cell-resistant helper CD4+ T cells by bacterial vector*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1404-12.
 103. Jellbauer, S., et al., *CD8 T-cell induction against vascular endothelial growth factor receptor 2 by Salmonella for vaccination purposes against a murine melanoma*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34214.
 104. Roeder, E., et al., *Invasion and destruction of a murine fibrosarcoma by Salmonella-induced effector CD8 T cells as a therapeutic intervention against cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(3): p. 371-80.
 105. Zhang, X.L., V.T. Jeza, and Q. Pan, *Salmonella typhi: from a human pathogen to a vaccine vector*. Cell Mol.Immunol., 2008. **5**(2): p. 91-97.

106. Cheminay, C. and M. Hensel, *Rational design of Salmonella recombinant vaccines*. Int J Med Microbiol, 2008. **298**(1-2): p. 87-98.
107. Leschner, S. and S. Weiss, *Salmonella-allies in the fight against cancer*. J Mol Med (Berl), 2010. **88**(8): p. 763-73.
108. Toso, J.F., et al., *Phase I study of the intravenous administration of attenuated Salmonella typhimurium to patients with metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2002. **20**(1): p. 142-52.
109. Gonzalez, C., et al., *Salmonella typhi vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum: strain construction and safety and immunogenicity in humans*. J Infect Dis, 1994. **169**(4): p. 927-31.
110. Nardelli-Haeffliger, D., et al., *Oral and rectal immunization of adult female volunteers with a recombinant attenuated Salmonella typhi vaccine strain*. Infect Immun, 1996. **64**(12): p. 5219-24.
111. Tacket, C.O., et al., *Safety and immunogenicity in humans of an attenuated Salmonella typhi vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system*. Infect Immun, 1997. **65**(8): p. 3381-5.
112. Tacket, C.O., et al., *Safety and immune responses to attenuated Salmonella enterica serovar typhi oral live vector vaccines expressing tetanus toxin fragment C*. Clin Immunol, 2000. **97**(2): p. 146-53.
113. Bumann, D., et al., *Safety and immunogenicity of live recombinant Salmonella enterica serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from Helicobacter pylori in human volunteers*. Vaccine, 2001. **20**(5-6): p. 845-52.
114. Metzger, W.G., et al., *Impact of vector-priming on the immunogenicity of a live recombinant Salmonella enterica serovar typhi Ty21a vaccine expressing urease A and B from Helicobacter pylori in human volunteers*. Vaccine, 2004. **22**(17-18): p. 2273-7.
115. Khan, S., et al., *Ability of SPI2 mutant of S. typhi to effectively induce antibody responses to the mucosal antigen enterotoxigenic E. coli heat labile toxin B subunit after oral delivery to humans*. Vaccine, 2007. **25**(21): p. 4175-82.
116. Li, Y., et al., *Evaluation of new generation Salmonella enterica serovar Typhimurium vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(2): p. 593-8.
117. Curtiss, R., 3rd, et al., *Salmonella enterica serovar typhimurium strains with regulated delayed attenuation in vivo*. Infect Immun, 2009. **77**(3): p. 1071-82.
118. Thaver, D., et al., *Fluoroquinolones for treating typhoid and paratyphoid fever (enteric fever)*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(4): p. CD004530.

-
119. Tran, T.H., et al., *Short course of ofloxacin for treatment of multidrug-resistant typhoid*. Clin Infect Dis, 1995. **20**(4): p. 917-23.
 120. Vinh, H., et al., *Two or three days of ofloxacin treatment for uncomplicated multidrug-resistant typhoid fever in children*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(4): p. 958-61.
 121. Nguyen, T.C., et al., *Short courses of ofloxacin for the treatment of enteric fever*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1997. **91**(3): p. 347-9.
 122. Crull, K. and S. Weiss, *Antibiotic control of tumor-colonizing Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Exp Biol Med (Maywood), 2011. **236**(11): p. 1282-90.
 123. Woodford, N. and D.M. Livermore, *Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge*. J Infect, 2009. **59 Suppl 1**: p. S4-16.
 124. Jean, S.S. and P.R. Hsueh, *High burden of antimicrobial resistance in Asia*. Int J Antimicrob Agents, 2011. **37**(4): p. 291-5.
 125. Holt, K.E., et al., *Emergence of a globally dominant IncHI1 plasmid type associated with multiple drug resistant typhoid*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(7): p. e1245.
 126. Ochiai, R.L., et al., *A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implications for controls*. Bull World Health Organ, 2008. **86**(4): p. 260-8.
 127. Umasankar, S., R.A. Wall, and J. Berger, *A case of ciprofloxacin-resistant typhoid fever*. Commun Dis Rep CDR Rev, 1992. **2**(12): p. R139-40.
 128. Gaind, R., et al., *Molecular characterization of ciprofloxacin-resistant Salmonella enterica serovar Typhi and Paratyphi A causing enteric fever in India*. J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(6): p. 1139-44.
 129. Loessner, H., et al., *Remote control of tumour-targeted Salmonella enterica serovar Typhimurium by the use of L-arabinose as inducer of bacterial gene expression in vivo*. Cell Microbiol, 2007. **9**(6): p. 1529-37.
 130. Berchtold, C., et al., *Superior protective immunity against murine listeriosis by combined vaccination with CpG DNA and recombinant Salmonella enterica serovar typhimurium*. Infect.Immun., 2009. **77**(12): p. 5501-5508.
 131. van Stipdonk, M.J., E.E. Lemmens, and S.P. Schoenberger, *Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 423-9.
 132. Kaech, S.M. and R. Ahmed, *Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 415-22.
 133. Jelley-Gibbs, D.M., et al., *Two distinct stages in the transition from naive CD4 T cells to effectors, early antigen-dependent and late cytokine-driven expansion and differentiation*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5017-26.

-
134. Mercado, R., et al., *Early programming of T cell populations responding to bacterial infection*. J.Immunol., 2000. **165**(12): p. 6833-6839.
135. Mercado, R., et al., *Early programming of T cell populations responding to bacterial infection*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 6833-9.
136. Portnoy, D.A., et al., *Molecular determinants of Listeria monocytogenes pathogenesis*. Infect Immun, 1992. **60**(4): p. 1263-7.
137. Southwick, F.S. and D.L. Purich, *Listeria and Shigella actin-based motility in host cells*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 1998. **109**: p. 160-72; discussion 172-3.
138. Lecuit, M., *Understanding how Listeria monocytogenes targets and crosses host barriers*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(6): p. 430-6.
139. Lecuit, M., et al., *A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen Listeria monocytogenes*. EMBO J, 1999. **18**(14): p. 3956-63.
140. Tam, M.A., et al., *Early cellular responses to Salmonella infection: dendritic cells, monocytes, and more*. Immunol Rev, 2008. **225**: p. 140-62.
141. Mittrucker, H.W. and S.H. Kaufmann, *Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(4): p. 457-63.
142. Chieppa, M., et al., *Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement*. J Exp Med, 2006. **203**(13): p. 2841-52.
143. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. Science, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
144. Niess, J.H. and H.C. Reinecker, *Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota*. Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 558-64.
145. Vallon-Eberhard, A., et al., *Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2465-9.
146. Salazar-Gonzalez, R.M., et al., *CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches*. Immunity, 2006. **24**(5): p. 623-32.
147. Rescigno, M., *CCR6(+) dendritic cells: the gut tactical-response unit*. Immunity, 2006. **24**(5): p. 508-10.
148. Jung, S., et al., *In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 211-20.
149. Schuurhuis, D.H., et al., *Ins and outs of dendritic cells*. Int Arch Allergy Immunol, 2006. **140**(1): p. 53-72.

-
150. Le Borgne, M., B. Dubois, and D. Kaiserlian, [*Dendritic cells of mucosa and skin: "recruited for vaccination"*]. *Med Sci (Paris)*, 2007. **23**(10): p. 819-25.
 151. Niess, J.H., *What are CX3CR1+ mononuclear cells in the intestinal mucosa?* *Gut Microbes*, 2010. **1**(6): p. 396-400.
 152. Nicoletti, C., J.L. Arques, and E. Bertelli, *CXCR1 is critical for Salmonella-induced migration of dendritic cells into the intestinal lumen.* *Gut Microbes*, 2010. **1**(3): p. 131-4.
 153. Domenech, V.E., et al., *Rapid clearance of a recombinant Salmonella vaccine carrier prevents enhanced antigen-specific CD8 T-cell responses after oral boost immunizations.* *Microbes Infect.*, 2005. **7**(5-6): p. 860-866.
 154. McSorley, S.J., et al., *Tracking salmonella-specific CD4 T cells in vivo reveals a local mucosal response to a disseminated infection.* *Immunity*, 2002. **16**(3): p. 365-77.
 155. Sundquist, M. and M.J. Wick, *TNF-alpha-dependent and -independent maturation of dendritic cells and recruited CD11c(int)CD11b+ Cells during oral Salmonella infection.* *J Immunol*, 2005. **175**(5): p. 3287-98.
 156. Paulin, S.M., et al., *Analysis of Salmonella enterica serotype-host specificity in calves: avirulence of S. enterica serotype gallinarum correlates with bacterial dissemination from mesenteric lymph nodes and persistence in vivo.* *Infect Immun*, 2002. **70**(12): p. 6788-97.
 157. Pullinger, G.D., et al., *Systemic translocation of Salmonella enterica serovar Dublin in cattle occurs predominantly via efferent lymphatics in a cell-free niche and requires type III secretion system 1 (T3SS-1) but not T3SS-2.* *Infect Immun*, 2007. **75**(11): p. 5191-9.
 158. Worley, M.J., et al., *Salmonella typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(47): p. 17915-20.
 159. Jarvik, T., et al., *Short-term signatures of evolutionary change in the Salmonella enterica serovar typhimurium 14028 genome.* *J Bacteriol*, 2010. **192**(2): p. 560-7.
 160. Kantele, A., et al., *Differential homing commitments of antigen-specific T cells after oral or parenteral immunization in humans.* *J Immunol*, 1999. **162**(9): p. 5173-7.
 161. Agace, W., *Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa.* *Immunol Lett*, 2010. **128**(1): p. 21-3.
 162. Eksteen, B., et al., *Gut homing receptors on CD8 T cells are retinoic acid dependent and not maintained by liver dendritic or stellate cells.* *Gastroenterology*, 2009. **137**(1): p. 320-9.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Holger Rüssmann für die Bereitstellung des spannenden Themas und die hervorragende Betreuung. Ich danke ihm für die vielen Ratschläge und den kreativen Austausch. Seine Unterstützung ging weit über die Durchführung dieser Promotionsarbeit hinaus.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann für die Möglichkeit, am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie zu promovieren.

Für die vielen Stunden, die ich mit meinen Laborkollegen und Freunden im Max von Pettenkofer-Institut verbringen durfte, bin ich ebenfalls sehr dankbar. Besonders erwähnen möchte ich Gudrun Pfaffinger, deren Fürsorge und Organisationstalent von einem unschätzbaren Wert waren, Klaus Panthel, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und Stefan Jellbauer, mit dem ich alle Höhen und Tiefen des Laboralltags durchlebt habe. Außerdem danke ich Brigitte Köhn, Christina Berchtold, Konrad Trülzsch, Xaver Seewald, Miriam Partilla, Andrea Kotz, Stefanie Rohrer und Virginie Nägele für eine unvergessliche Zeit in der Pettenkoferstrasse.

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. med. Dirk Busch und seinen Mitarbeitern für die freundliche Bereitstellung der p60-Tetramere.

Herzlich danken möchte ich meinen Eltern und meiner großen Familie. Durch ihre Unterstützung wurden mir das Medizinstudium und die Durchführung dieser Promotionsarbeit überhaupt erst ermöglicht.