

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie

Entwicklung eines Lebend- und eines Totimpfstoffes gegen intrazelluläre
Erreger auf Basis von *Yersinia enterocolitica*

Robert Leibiger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel
2. Priv.-Doz. Dr. K. Trülsch

(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 04.12.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
am 25.03.2010 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von PD Dr. K. Trülsch angefertigt.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Entwicklung eines Lebend- und eines Totimpfstoffes gegen intrazelluläre Erreger auf Basis von
Yersinia enterocolitica

in der Abteilung für Bakteriologie des Max von Pettenkofer-Institutes für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Anleitung und Betreuung durch PD Dr. Konrad Trülzsch ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

- Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.
- Die vollständige Dissertation wurde in veröffentlicht. Die Fakultät für hat der Vorveröffentlichung zugestimmt.
- Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.
- Ich habe bereits am bei der Fakultät für der Hochschule unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema ... die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den 27.11.2009

Robert Leibiger

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	IV
A EINLEITUNG	1
A.1 Vakzine	1
A.1.1 Lebendimpfstoffe	2
A.1.2 Totimpfstoffe	2
A.2 Immunsystem	3
A.2.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem	3
A.2.2 Prozessierung und Präsentation von Antigenen	4
A.2.2.1 MHC-I-Präsentation	5
A.2.2.2 MHC-II-Präsentation	5
A.2.3 T-Zell-Aktivierung	6
A.3 Yersinia	7
A.3.1 <i>Y. enterocolitica</i>	7
A.3.2 Pathogenitätsfaktoren	8
A.3.2.1 Adhärenz und Invasion	9
A.3.2.2 Typ III Sekretionsystem	10
A.3.2.3 Das Virulenz-Antigen (V-Antigen, LcrV)	11
A.3.2.4 Yop Effektorproteine	12
A.3.2.5 Translokation von Yops	14
A.3.3 <i>Yersinia enterocolitica</i> als Lebendvektor	15
A.4 <i>Listeria monocytogenes</i> als Infektionsmodell	16
A.5 Ziel der Arbeit	17
B MATERIAL UND METHODEN	18
B.1 Material	18
B.1.1 Geräte	18
B.1.2 Bezugsquellen für Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	19
B.2 Bakteriologische Arbeiten	20
B.2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Primer	20
B.2.1.1 Bakterienstämme	20
B.2.1.2 Plasmide	21
B.2.1.3 Primer	23
B.2.2 Nährmedien, Antibiotika und Medienzusätze	24
B.2.2.1 Nährmedien	24
B.2.2.2 Antibiotika und Medienzusätze	25
B.2.3 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien	26
B.2.3.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> und <i>Yersinia sp.</i>	26
B.2.3.2 Anlegen einer Stammsammlung	26
B.2.3.3 Anlegen einer Bakterienkultur für <i>in vivo</i> Infektionen	27
B.2.3.4 Lebendkeimzahlbestimmung für <i>in vivo</i> Infektionsversuche	27
B.2.3.5 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen für <i>in vitro</i> Infektionsversuche	27
B.3 Molekularbiologische Methoden	27
B.3.1 Isolierung und photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	27
B.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA	27
B.3.1.2 Isolierung genomischer DNA	28
B.3.1.3 Fällung von DNA	28
B.3.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	28
B.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29

B.3.2.1	Colony-Screen	29
B.3.2.2	Reaktionsbedingungen der PCR	30
B.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	30
B.3.3.1	Analytische Gelelektrophorese	31
B.3.3.2	Färbung von Agarosegelen mit Ethidiumbromid	32
B.3.4	Sequenzierung von DNA	32
B.3.5	Enzymatische Modifikation von DNA	32
B.3.5.1	Restriktionsverdau von DNA durch Endonukleasen	32
B.3.5.2	Dephosphorylierung von DNA	33
B.3.5.3	Ligation	33
B.3.6	Transformation von DNA	33
B.3.6.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	33
B.3.6.2	Elektroporation	34
B.3.7	Herstellung von Deletionsmutanten durch homologe Rekombination (ET-Cloning)	34
B.3.7.1	Herstellung elektrokompenter Stämme für die Mutagenese	35
B.3.7.2	Primerdesign	35
B.3.7.2.1	Herstellung des PCR-Produktes für die Rekombination	35
B.3.7.2.2	Elektroporation und Selektion der Deletionsmutanten	35
B.3.8	LPS-Präparation mittels Proteinase K-Verdau	36
B.4	Proteinbiochemische Methoden	36
B.4.1	Expression und Reinigung von Proteinen mit His ₆ -Tag	36
B.4.1.1	Überexpression von Proteinen mit His ₆ -Tag	37
B.4.1.2	IMAC-Aufreinigung von Proteinen mit His ₆ -Tag	37
B.4.1.3	Gelfiltration	38
B.4.2	Isolierung von sekretierten Yop Proteinen aus dem Kulturüberstand	38
B.4.3	Auftrennung von Proben mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	39
B.4.4	Färben von SDS-Gelen	41
B.4.4.1	Coomassie-Färbung	41
B.4.4.2	Silberfärbung	41
B.4.5	Western Blot Analyse	42
B.4.6	Proteinquantifizierung nach Bradford	43
B.5	Zellkultur	43
B.5.1	Zellkulturmedien, Zusätze und Peptide	43
B.5.2	Eukaryotische Zellen	44
B.5.3	Kultivierung eukaryotischer Zellen	44
B.5.3.1	Kultivierung von Zelllinien	44
B.5.3.2	Neuanlage und Kultivierung von spezifischen T-Zellen	45
B.5.3.3	Behandlung von Milzzellen mit Mitomycin C	45
B.5.3.4	Differenzierung von Knochenmarkszellen	46
B.5.4	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mittels Neubauer-Zählkammer	46
B.5.5	Infektion von eukaryotischen Zellen mit <i>Y. enterocolitica</i>	46
B.5.6	<i>in vitro</i> Antigenpräsentationsassay (APA)	47
B.6	Infektionsversuche an Mäusen	47
B.6.1	Mausstämme	47
B.6.2	Mauspassage	48
B.6.3	Infektions- und Immunisierungsexperimente	48
B.6.3.1	Applikationsformen	48
B.6.3.1.1	Orale Infektion	48
B.6.3.1.2	Intraperitoneale (i.p.) Infektion / Immunisierung	48
B.6.3.1.3	subkutane (s.c.) Immunisierung	48
B.6.3.1.4	intravenöse (i.v.) Infektion und Applikation von Antibiotika	49
B.6.3.2	Kolonisierung / zelluläre Immunantwort	49
B.6.3.3	Immunisierungsexperimente	50
B.6.3.4	Schutzversuch / Challenge	50
B.7	Immunologische Methoden	50
B.7.1	Entfernung von Endotoxin und dessen Konzentrationsbestimmung	50
B.7.2	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	51

B.7.3	ELISpot-Assay (enzyme-linked immunospot assay)	51
B.7.4	Durchflußzytometrie / FACS	52
B.7.4.1	Tetramerfärbung	52
B.7.4.2	Durchflußzytometrie-Messung (FACS-Analyse)	53
B.8	Statistische Auswertung	53
C	ERGEBNISSE	54
C.1	<i>Yersinia</i>-Deletionsmutanten als Impfstoffträger	54
C.1.1	Herstellung von <i>Yersinia</i> -Doppelmutanten	54
C.1.2	Sekretion und Translokation des heterologen Antigens <i>in vitro</i>	58
C.1.3	<i>In vitro</i> Antigenpräsentation	59
C.1.4	Virulenz der <i>yop</i> -Mutanten im Mausmodell	60
C.1.4.1	Virulenz der <i>yop</i> -Mutanten nach oraler Infektion	60
C.1.4.2	Virulenz der <i>yop</i> -Mutanten nach i.v. Infektion	62
C.1.5	Stabilität des pHR430-Plasmids	64
C.1.6	Immunantwort auf das YopE-LLO-Fusionsprotein im Mausmodell	64
C.1.6.1	Zelluläre Immunantwort nach oraler Infektion	64
C.1.6.2	Zelluläre Immunantwort nach i.v.-Infektion	66
C.1.7	Schutzversuche gegen eine <i>L. monocytogenes</i> Infektion	67
C.2	LcrV-Fusionsproteine als Impfstoffträger	68
C.2.1	Herstellung und Screening einer LPS-Mutante	69
C.2.2	Klonierung, Expression und Aufreinigung der (Fusions-)proteine	70
C.2.2.1	Klonierung der Proteine	70
C.2.2.2	Expression und Aufreinigung der Proteine	70
C.2.3	Immunantwort auf LcrV-LLO-Fusionsproteine im Mausmodell	71
C.2.3.1	Immunisierungen	71
C.2.3.2	Messung der CD4 und CD8 T-Zellantwort mit ELISpot-Assay	72
C.2.3.3	Messung der CD4 und CD8 T-Zellantwort mittels FACS-Analyse	74
C.2.3.4	Schutzversuche gegen eine <i>L. monocytogenes</i> -Infektion	76
D	DISKUSSION	77
D.1	Einfluss der Yop Effektorproteine auf Virulenz und Antigenpräsentation	78
D.1.1	Konstruktion genetisch stabiler <i>yopP</i> Deletionsdoppelmutanten	78
D.1.2	Sekretion des YopE-LLO-Fusionsproteins	78
D.1.3	Einfluß der Yops auf die Antigenpräsentation dendritischer Zellen	79
D.1.4	Virulenzstudien im Mausinfektionsmodell	80
D.2	Untersuchung der Immunantwort auf ein heterologes Antigen	82
D.2.1	Lebendvektoren induzieren zelluläre Immunantwort <i>in vivo</i>	82
D.2.2	Durch Lebendvektoren vermittelter Schutz vor <i>Listeria</i> Wildtyp Infektion	84
D.3	Untersuchung der LcrV-LLO-Fusionsproteine als Totimpfstoff	85
D.3.1	Herstellung der Proteinimpfstoffe	85
D.3.2	Induktion einer spezifischen Immunantwort durch Proteinimmunisierung	86
D.3.3	Schutz vor <i>Listeria</i> Wildtyp Infektion nach Proteinimmunisierung	87
E	ZUSAMMENFASSUNG	89
	LITERATURVERZEICHNIS	91
	PUBLIKATIONSLISTE	104
	DANKSAGUNG	105

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin, Ampere
Abb.	Abbildung
ACT	Ammoniumchlorid-Tris
AK	Antikörper
ÄM	äußere Membran
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAP	Bakterielle alkalische Phosphatase
BCIP/NBT	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat / Nitroblautetrazoliumchlorid
BHI	Brain-Heart-Infusion
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDS	kodierende Sequenzen („coding sequence“)
CFU	“colony forming unit”
Cip	Ciprofloxacin-Hydrochlorid
CIN	Cefsulodin- Irgasan- Novobiocin-
Cm	Chloramphenicol
Δ	Delta
Da	Dalton
DC	dendritische Zelle
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	et alteri: und andere
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin, Glyzin
Gm	Gentamicin
GM-CSF	„Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor“
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase
IM	innere Membran
IL	Interleukin
INF γ	Interferon-gamma
Inv	Invasin
i.p.	Intraperitoneal
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
i.v.	intravenös
K	Lysin
k-	Kilo- (10^3)
kb	Kilobasenpaare
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LB	Luria-Bertani
Lcr	Low calcium response
LD ₅₀	lethale Dosis 50; die Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere sterben
LPS	Lipopolysaccharid
LLO	Listeriolysin O
log ₁₀	Dekadischer Logarithmus
m	milli (10^{-3}), Meter
M	molar
μ	mikro (10^{-6})
μ F	Mikrofarad
MCS	multiple cloning site
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
n	nano (10^{-9})
N-	Amino-
NaOH	Natriumhydroxid
PFA	Paraformaldehyd
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)

Ω	Ohm
P.	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
Pen	Penicillin
PP	Peyer'sche Plaques
pH	pondus Hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration in einer wässrigen Lösung
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	„pounds per square inch“; 1 psi = 6,895 kPa
pYV	<i>Yersinia</i> virulence Plasmid
Q	Glutamin
rcf	relative centrifugal force, g-Faktor
rm	rekombinantes, murines
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
x ^r	X-resistent
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SH	Spectinomycin
sp.	Species
Strep	Streptomycin
Syc	specific Yop chaperone
T3SS	Typ III Sekretionssystem („type three secretion system“)
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.	und
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
üNK	Übernachtkultur
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.	von
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen, Volumina

W	Watt
w/v	Masse pro Volumen
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsion A
Yop	<i>Yersinia</i> outer protein
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

A EINLEITUNG

Die Geschichte der Impfungen begann 1796, als der englische Landarzt Edward Jenner die Beobachtung machte, daß mit Kuhpocken infizierte Menschen vor einer echten Pockeninfektion geschützt waren. Dies verifizierte er, indem er einen Jungen mit Kuhpocken infizierte. Nach dessen Genesung wurde er mit Menschenpocken infiziert, was ohne Schutz wohl zum Tode geführt hätte. Erst Robert Koch bewies im 19. Jhd., daß Infektionskrankheiten durch Mikroorganismen hervorgerufen werden. Im Laufe der Zeit erlangte man genauere Kenntnisse über die Verbreitung und Art von Infektionserregern, welche eine verbesserte und systematische Entwicklung von Impfstoffen zur Folge hatte. Trotz großer Erfolge, wie z.B. die Ausrottung der Pockenviren von 1979, sind Infektionskrankheiten auch heute noch eine ernst zu nehmende Gefahr. Immer noch gibt es gegen bestimmte Krankheiten keine oder nur wenig wirksame Impfstoffe, was auch an der Komplexität der Pathogenität liegt (Malaria, HIV). Auch der Wirkungsverlust einer Impfung gegen sich ständig verändernde Erreger (z.B. Influenza) oder das Entstehen von neuen humanpathogenen Erregern (SARS, „Schweinegrippe“) erfordert die Entwicklung neuer Impfstoffe. Diese wird durch einen tieferen Einblick in die Mechanismen der Pathogenität der Erreger sowie der Abwehrmechanismen des Wirtes unterstützt.

A.1 Vakzine

Das generelle Ziel einer Impfung ist es, einen möglichst (lebens)langen Schutz hervorzurufen. Für einen Teil der Impfstoffe bedeutet dies, eine humorale Immunantwort zu induzieren, die zur Bildung von langlebigen Plasmazellen führt. Diese Zellen produzieren spezifische Antikörper, die die Ausbreitung der Erreger verhindern und deren Eliminierung beschleunigen können. Gegen intrazelluläre Erreger wie z.B. Viren ist eine strikt humorale Immunantwort ungeeignet. Hier wird eine zelluläre Immunantwort benötigt, die auf spezifischen T-Zellen basiert. Die Immunität gegen intrazelluläre Erreger wird durch $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen vermittelt. $CD8^+$ T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, erkennen und eliminieren infizierte Zellen und sind zudem in der Lage, Zytokine auszuschütten (Amara *et al.* 2005). $CD4^+$ T-Zellen sekretieren Lymphokine und locken Phagozyten durch Chemotaxis an. Diese zelluläre Immunantwort kann durch Lebendimpfstoffe aktiviert werden. Nicht nur die Wahl der Art des Vakzins, sondern auch deren Applikation spielt für die Immunität eine wichtige Rolle. Viele Vakzine werden intramuskulär verabreicht, was zu einer systemischen Immunantwort führt (Michalek *et al.* 1995). Nutzen Krankheitserreger mukosale Oberflächen wie z.B. den Gastrointestinaltrakt als Eintrittspforte, so stellt die orale Verabreichung eine Möglichkeit dar, neben der systemischen, eine an der Eintrittspforte, lokale Immunantwort zu induzieren (Heesemann *et al.* 1993; Everest *et al.* 1995; Levine *et al.* 1998). Dadurch kann eine

Besiedelung eines pathogenen Erregers unterdrückt werden. Als weiterer Vorteil ist die leichte Handhabung solcher Vakzine zu nennen, vor allem in Hinblick auf Impfungen in Entwicklungsländern, sowie die Tatsache, daß keine Kanülen und Spritzen verwendet werden müssen.

A.1.1 Lebendimpfstoffe

Lebendimpfstoffe sind attenuierte Pathogene, die mindestens zum Großteil die Fähigkeit verloren haben, unerwünschte Krankheitssymptome hervorzurufen. Die Attenuierung soll eine vererbare, nicht reversible Eigenschaft des Pathogens sein, die nicht durch Änderung der Ernährung und der Darmflora des Wirtes beeinflusst wird. Ein Lebendimpfstoff braucht aber eine ausreichende Virulenz, um invadieren und persistieren zu können, um so eine gute primäre als auch adaptive Immunantwort zu stimulieren. Unter Lebendimpfstoffe fallen auch Lebendvektoren („carrier strains“). Dies sind attenuierte Bakterien, die Gene für heterologe Antigene tragen, und dieses stabile exprimieren. Solch ein Vakzin ermöglicht die Immunisierung gegen ein anderes Pathogen. Der Vorteil von Lebendvakzinen liegt darin, mit einer einzelnen oder wenigen Dosen ohne Verwendung von Adjuvantien einen Schutz erzielen zu können. Der Prototyp eines attenuierten Lebendimpfstoffs ist das Vacciniavirus, das für die Pockenimpfung zum Einsatz kam.

A.1.2 Totimpfstoffe

Neben den Lebendimpfstoffen gibt es die Gruppe der Totimpfstoffe, deren großer Vorteil darin besteht, daß sie in immunsupprimierten Patienten keine systemische Infektion auslösen können. Diese Vakzine bestehen aus abgetöteten bzw. inaktivierten Bakterien oder Viren. Auch Fragmente des Erregers können für eine Immunisierung verwendet werden. Diese werden z.B. im Falle der Hepatitis B-Impfung rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Ferner gibt es die Möglichkeit mit synthetischen Peptiden oder mit DNA zu immunisieren. Da diese Impfstoffe sich im Körper nicht vermehren können, sind mehrmalige Gaben sowie die Verwendung von Adjuvantien von Nöten. Sie können hohe Titer an spezifischen Antikörpern erzeugen und einen langen Schutz gewährleisten. Gegen viele intrazelluläre Erreger ist eine rein humorale Immunantwort nicht ausreichend, sondern es muss auch die zelluläre Immunantwort stimuliert werden.

A.2 Immunsystem

A.2.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus Zellen und Geweben mit der Aufgabe, den Organismus vor Krankheitserregern und Tumoren zu schützen. Dieses System wird in das angeborene und adaptive (erworbene) Immunsystem unterteilt. Der wichtigste Punkt bei der Abwehr ist das Erkennen und die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden. Sobald etwas als fremd erkannt wurde, wird das Immunsystem mit einer Vielzahl von Abwehrmechanismen aktiviert, wie die Sekretion von Zytokinen, der Antigenpräsentation und der Produktion von Antikörpern.

Das angeborene Immunsystem dient der schnellen, ersten, unspezifischen Abwehr durch Makrophagen, Dendriten, Monozyten, Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie dem Komplementsystem und Zytokinen. Die Zellen des angeborenen Immunsystems reagieren innerhalb von Stunden nach Infektion und erkennen Mikroorganismen anhand von molekularen Mustern, PAMPs genannt (*pathogen-associated molecular patterns*). Auch das Fehlen von MHC-Molekülen führt zur Eliminierung. PAMPs sind u.a. Strukturen der mikrobiellen Membran oder Zellwand und werden durch bestimmte Rezeptoren erkannt (*toll-like receptors*, TLRs). Werden die Immunzellen aktiviert, beginnen sie mit der Sekretion von Effektormolekülen (Zytokine) wie IL1, IL8, IL12 oder TNF α . Dadurch wird die Entzündungsreaktion ausgelöst, was zur Anlockung von weiteren Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems führt (Abbas *et al.* 2003).

Das erworbene Immunsystem besteht aus Antigen-spezifischen Lymphozyten, die man in B- und T-Lymphozyten unterscheidet. B-Zellen erkennen aufgrund ihrer membrangebundenen Immunglobuline (Ig; Antikörper) ein spezifisches Antigen. Werden B-Zellen durch einen Antigenkontakt aktiviert, differenzieren sie sich und beginnen mit der Zellteilung, was am Ende zur Ausbildung von Antikörper sezernierenden Plasmazellen führt (Slifka *et al.* 1998). Die Antikörper sind lösliche, Y-förmige Proteine, welche sich in fünf Klassen einteilen lassen (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE); je nach ihrer konstanten Fußregion, die die Effektorfunktion bestimmt. Die Antikörper binden spezifisch Antigene und bewirken so eine Opsonisierung von Mikroorganismen oder die Aktivierung des Komplementsystems. T-Zellen erkennen über den T-Zell Rezeptor (TCR) Antigene nur in einem Komplex mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC). Damit eine T-Zelle optimal aktiviert wird, benötigt sie neben der Bindung des TCR an den Antigen-MHC-Komplex ein kostimulierendes Signal, welches von derselben antigenpräsentierenden Zelle gegeben werden muss; u.a. über Moleküle der Glykoprotein B7-Familie (Coyle *et al.* 2001).

Nach der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten kommt es anschließend zur klonalen Selektion und Differenzierung zu Effektorzellen, die eine begrenzte Lebenszeit haben und nach der Beseitigung des Antigenträgers zum Großteil absterben. Ein Teil der Zellen überlebt und wird zu langlebigen Gedächtniszellen („memory cells“) (Ahmed *et al.* 1996). Diese bilden die Grundlage des

immunologischen Gedächtnisses und ermöglichen bei erneuter Infektion mit einem Erreger eine schnellere und wirksamere Reaktion, wodurch die Auswirkungen der Erkrankung vermindert oder ganz verhindert werden können. Ziel eines Vakzins ist es, eine große Anzahl solcher langlebigen Gedächtniszellen zu induzieren (Masopust *et al.* 2004).

A.2.2 Prozessierung und Präsentation von Antigenen

Die Prozessierung und Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche ist ein wichtiger Schritt für die Erkennung und Eliminierung von Mikroorganismen durch das adaptive Immunsystem. Die Zellen, die das bewerkstelligen, werden antigenpräsentierende Zellen (*antigen-presenting cells*, APCs) genannt, zu denen Makrophagen und dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) zählen. Vorläufer-DCs befinden sich im Blut, der Lymphe und dem Lymphgewebe, von wo aus sie ins Gewebe einwandern, dort ansässig werden und zu unreifen DCs werden. Nach Antigenaufnahme (Phagozytose) wandern sie über die afferenten Lymphbahnen in das Lymphgewebe und reifen währenddessen zu professionellen DCs heran (*mature DCs*). Im lymphatischen Gewebe interagieren die DCs mit T-Zellen. Der Antigenaufnahme durch die unreifen DCs folgt, während der gleichzeitigen Reifung der Zellen, das Degradieren, Prozessieren und Präsentieren der Antigene. In der Zelle wird das aufgenommene Antigen durch Proteasen in kleine Peptide zerlegt und auf MHC-Moleküle beladen. Diese Peptid-MHC-Komplexe werden an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert. Erst durch diese Präsentation und einem Kostimulus wird das Antigenpeptid von T-Zellen erkannt und diese damit aktiviert. Unreife DCs exprimieren kaum MHC- sowie kostimulatorische Moleküle, wodurch die Antigenpräsentation noch ineffizient ist. Erst während der Reifung wird die Expression beider Moleküle erhöht, wodurch eine verbesserte Stimulation von T-Zellen erreicht wird (Banchereau *et al.* 1998; Banchereau *et al.* 2000).

Es gibt zwei unterschiedliche MHC-Molekültypen auf denen das Antigen abhängig von dessen Lokalisation (intra- oder extrazellulär) präsentiert wird. Während MHC-Klasse-I-Komplexe entscheidend an der Bekämpfung von Tumorzellen und intrazellulären Erregern wie z.B. Viren beteiligt sind, werden MHC-Klasse-II-Moleküle für die Stimulation der antikörpervermittelten Immunantwort zur Bekämpfung extrazellulärer Pathogene gebraucht. Diese zwei MHC-Typen unterscheiden sich in ihrer Struktur, dem Beladungsweg sowie dem zur Aktivierung von T-Zellen nötige Korezeptor. Der Korezeptor von MHC-I ist der CD8-Rezeptor und von MHC-II der CD4-Rezeptor (Morrison *et al.* 1986; Chapman 1998).

A.2.2.1 MHC-I-Präsentation

Intrazelluläre Proteine werden auf MHC-I-Molekülen, die konstitutiv auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, präsentiert. Die Größe des gebundenen Peptids beträgt 8-11 Aminosäuren. Aufgrund einer geschlossenen Bindungstasche passen keine größeren Peptide hinein, sodaß das Antigen/intrazelluläre Protein in kleine Fragmente zerlegt werden muss. Die Degradation von intrazellulären Proteinen findet im Zytosol der APCs durch das Proteasom statt. Die Peptide werden durch den Antigenpeptid Transporter (TAP) in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert und dort auf das MHC-I-Molekül beladen. Von dort wird der MHC-I-Peptid-Komplex mittels Vesikel durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert und dort den $CD8^+$ T-Zellen präsentiert (Pamer *et al.* 1998; Abbas *et al.* 2003). Abbildung 1 zeigt eine gekürzte Übersicht der MHC-I-Präsentation.

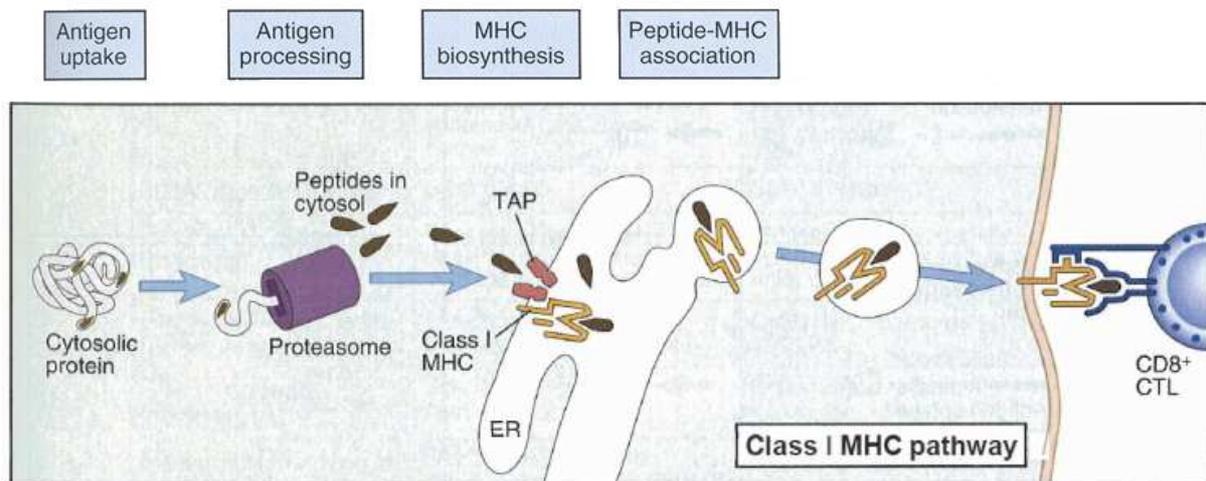


Abbildung 1: Kurze Zusammenfassung der MHC-I –Präsentation (nach Abbas, Lichtman "Cellular and Molecular Immunology" 5th Edition. Saunders Company, 2003)

A.2.2.2 MHC-II-Präsentation

MHC-II-Moleküle befinden sich auf DCs, B-Zellen und auf Makrophagen und haben keine geschlossene Bindungstasche, wodurch die zu präsentierende Peptidgröße 30 Aminosäuren betragen kann. Im Gegensatz zu der MHC-I-Präsentation werden auf MHC-II-Molekülen extrazelluläre Antigene präsentiert. Die Antigene werden endozytiert und im Endosom fragmentiert. Vesikel mit MHC-II-Molekülen werden vom ER freigesetzt und verschmelzen anschließend mit dem Endosom, in dem die Komplexbildung von MHC-II und Peptid stattfindet. Von dort aus werden die MHC-II-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert und den $CD4^+$ T-Zellen präsentiert (Germain 1994; Abbas *et al.* 2003). Eine Übersicht über den Ablauf der MHC-II-Präsentation zeigt Abbildung 2.

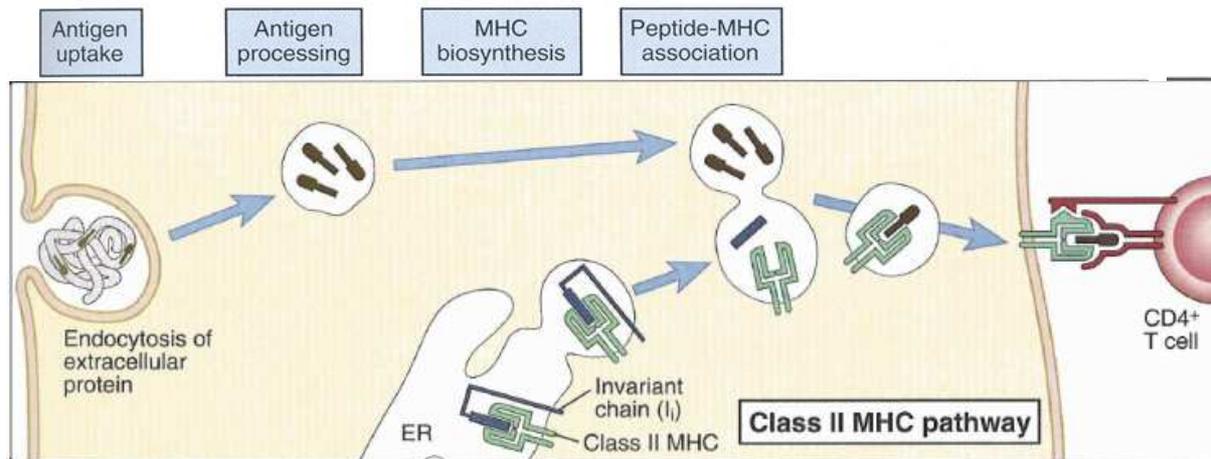


Abbildung 2: Kurze Zusammenfassung der MHC-II –Präsentation (nach Abbas, Lichtman "Cellular and Molecular Immunology" 5th Edition. Saunders Company, 2003)

A.2.3 T-Zell-Aktivierung

Aufgrund der Eigenschaft, daß nach der Entwicklung im Thymus nur einer der zwei Korezeptoren exprimiert wird, lassen sich T-Zellen in zwei Klassen einteilen: in CD4⁺ und CD8⁺.

Neben der Bindung eines MHC-Peptid-Komplexes an den TCR werden zur Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen kostimulatorische Moleküle benötigt. Am wichtigsten dabei sind CD80 und CD86 aus der Glykoprotein B7-Familie, die an den CD28 Rezeptor der T-Zellen binden. Fehlen die Korezeptoren auf den APCs führt dies zum Ausbleiben einer Antwort der T-Zelle, zur Anergie oder zur Apoptose. Nach erfolgreicher Aktivierung kommt es zur Proliferation der Effektorzellen sowie der Eliminierung des Erregers. Als Folge der starken Abnahme des Antigens kommt es zur Apoptose des Großteils der Effektorzellen. Ein kleiner Teil der T-Zellen überlebt und entwickelt sich zu langlebigen Gedächtniszellen, deren homeostatische Proliferation kontrolliert wird, um eine stabile Anzahl zu gewährleisten und um gegen weitere Infektionen geschützt zu sein (Zinkernagel 2000; Sprent *et al.* 2001; Dooks *et al.* 2002).

Die Aktivierung von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zelle ist vom Prinzip her gleich, jedoch unterscheiden sich die daraus resultierenden Effektorfunktionen. CD4⁺ T-Zellen sind regulatorische T-Zellen oder T-Helferzellen (Th) und werden aufgrund der sekretierenden Zytokine unterteilt: in Th1 und Th2. Die wichtigsten Zytokine der Th1-Zellen ist das IFN γ und das IL2, die der Th2-Zellen IL4, IL5, IL10 und IL13 (Kamogawa *et al.* 1993; Seder *et al.* 1994; Agarwal *et al.* 1998). Die Sekretion von IFN γ durch Th1-Zellen bewirkt die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen, wodurch eine zelluläre Immunantwort verstärkt wird. Th2-Zellen unterstützen durch ihre Zytokinausschüttung die humorale Immunantwort durch die Aktivierung von B-Zellen. Regulatorische T-Zellen, auch „Suppressor T-Zellen“ genannt, dienen zur Kontrolle antigenspezifischer Immunreaktionen. Die Rolle der CD4⁺ T-

Zellen ist die Überwachung, Steuerung des Immunsystems und das Bindeglied zwischen humoraler und zellulärer Immunität.

Die Aufgabe der CD8⁺ T-Zellen ist die Erkennung und Eliminierung von entarteten oder infizierten Zellen. Werden naive CD8⁺ T-Zellen aktiviert, differenzieren sie sich zu zytotoxischen T-Zellen, kurz CTLs, die bestimmte Faktoren wie Perforin oder Granzyme sekretieren, um die Lyse bzw. Apoptose der präsentierenden Zelle einzuleiten (Zinkernagel *et al.* 1974; Townsend *et al.* 1989; Kagi *et al.* 1996). Auch die erhöhte Expression von FasL auf CTLs führt über die Aktivierung von Kaspasen zur Apoptose (Shresta *et al.* 1998). Ferner werden IFN γ und TNF sekretiert, um Makrophagen zu aktivieren und Leukozyten zu rekrutieren. Um zu verhindern, daß nicht-entartete oder nicht-infizierte Zellen eliminiert werden, wird im Laufe ihres Entwicklungsprozesses auf selbsttolerante T-Lymphozyten selektioniert (von Boehmer 1994).

A.3 *Yersinia*

Namensgebend für die Gattung *Yersinia* war Alexandre Yersin, der zur Zeit der Hongkong-Pest 1894 den Erreger der Pest entdeckte (Yersin 1994). Seit 1964 werden die gram-negativen, stäbchenförmigen Yersinien der Familie der Enterobacteriaceae zugeordnet (Frederiksen 1964). Die Gattung *Yersinia* umfasst 11 Arten, von denen drei relevante Humanpathogene sind: der Pesterreger *Yersinia pestis* und die Enteropathogene *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* (Brenner 1979). Sie gehören nach Salmonellen und *Campylobacter jejuni* zu den dritthäufigsten bakteriellen Enteritiserregern. Das Wachstumsoptimum liegt bei 28 °C; da Yersinien psychrophil sind, können sie sich auch bei Temperaturen zwischen 0-4 °C vermehren. Im Unterschied zu *Y. pestis* sind die enteropathogenen *Yersinia* bei 28 °C peritrich begeißelt; eine Eigenschaft, die bei 37 °C verloren geht.

A.3.1 *Y. enterocolitica*

Aus verschiedenen Umweltquellen wie kontaminiertes Wasser und Pflanzenoberflächen kann *Y. enterocolitica* isoliert werden. Daneben sind sie in Haus- und Wildtieren nachzuweisen, wobei das Schwein eines der Hauptreservoirs ist (Shayegani *et al.* 1981; Marranzano *et al.* 1993). Auf Grund biochemischer Eigenschaften läßt sich *Y. enterocolitica* in 6 Biovare unterteilen: 1A, 1B, 2, 3, 4, und 5. Medizinische Bedeutung haben das Biovar 1B in Nordamerika und die Biovare 2 und 4 in Europa. Die Biovare 3 und 5 sind in der Regel tierpathogen (z.B. Ziege, Hase); zum Biovar 1A gehören überwiegend apathogene Stämme (Tauxe *et al.* 1987). Die Einteilung in verschiedene O-Serotypen erfolgt bei Yersinien durch Antiseren gegen Oberflächenantigene, die auf der unterschiedlichen Zusammensetzung der Lipopolysaccharide (O-Antigen) beruht. Das Biovar 1B umfasst die medizinisch relevanten Serotypen O:4, O:8, O:13, O:18, O:20 und O:2. Die humanpathogenen

Stämme der Biovare 2 und 4 besitzen die Serotypen O:3, O:5,27 und O:9, wobei der vorherrschende *Y. enterocolitica* Serotyp in Deutschland mit 90 % der Serotyp O:3 ist (Bottone 1997).

Die Infektion mit *Y. enterocolitica* erfolgt oral über kontaminierte Nahrungsmittel wie Wasser oder Fleisch und führt nach einer Inkubationszeit von 7-10 Tagen zu einer akuten Yersiniose (Black *et al.*, 1978). Die dabei auftretenden unspezifischen Symptome sind Bauchschmerzen, Fieber, wässrige Durchfälle und Erbrechen. Weitere klinische Krankheitsbilder sind die mesenteriale Lymphadenitis, eine chronisch rezidivierende Ileitis („Pseudo-Crohn“) und eine Enterocolitis. Die Symptome der Yersiniose sind abhängig von Alter, Immunsystem und Geschlecht des Patienten (Heesemann 1994). Meist verläuft die Yersiniose selbstlimitierend, es kann aber bei Patienten mit Vorerkrankung (z.B. Immunsuppression, Diabetes mellitus, Leberzirrhose, Dialyse-Patienten) zu septischen Infektionen und schweren Verlaufsformen kommen (Rabson *et al.* 1975). Septische Verläufe müssen antibiotisch therapiert werden. In der Regel sind Tetracyclin, Aminoglykoside oder Gyrasehemmer wirksame Therapeutika.

A.3.2 Pathogenitätsfaktoren

Die Pathogenitätsfaktoren von Yersinien sind chromosomal als auch plasmid-kodiert. Essentiell für die Pathogenität aller drei humanpathogenen Yersinien ist das Vorhandensein eines 70 kb großen Virulenzplasmides (pYV), welches hauptsächlich das Typ III-Sekretionssystem (TTSS) und die Effektorproteine (*yersinia outer proteins*, Yops) kodiert (Portnoy *et al.* 1985; Cornelis *et al.* 1989). Ferner enthält das pYV-Plasmid Gene für verschiedene Chaperone, welche meist in Operons mit den Sekretionssubstraten/Effektorproteinen kodiert sind. In Abbildung 3 ist das 70 kb große pYV Plasmid mit allen bisher identifizierten und potentiellen Genen dargestellt.

Kolonisierung von Milz und Leber eng mit der Fähigkeit, sich im Darmlumen zu vermehren, verknüpft ist (Barnes *et al.* 2006). YadA (*Yersinia* Adhäsion A), früher auch Yop1 oder P1 genannt, ist das einzige plasmidkodierte Adhäsion (Bolin *et al.* 1984; Balligand *et al.* 1985) und bildet in der äußeren Membran ein 200 kDa großes Trimer mit einer charakteristischen „Lollipop“-Struktur, das an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen, Fibronectin und Laminin bindet (Schulze-Koops *et al.* 1993; Hoiczky *et al.* 2001). Zudem kann es über β 1-Integrine die Internalisierung von *Yersinia* ermöglichen (Bliska *et al.* 1993; Yang *et al.* 1993) und trägt durch die Hemmung der Komplement vermittelten Opsonisierung der Bakterienzelle zur Phagozytoseresistenz bei (China *et al.* 1993).

A.3.2.2 Typ III Sekretionsystem

Das Typ III Sekretionssystem stellt ein komplexes Proteintransportsystem dar, welches die innere und äußere Bakterienmembran sowie die Plasmamembran der Wirtszelle durchspannt und es so erlaubt, Effektorproteine (*Yersinia* outer proteins, Yops) in das Zytosol eukaryotischer Zellen zu translozieren. Ein solches Sekretionssystem ist nicht *Yersinia*-spezifisch. Es ist auch in anderen gram-negativen Human-, Tier- und Pflanzenpathogenen zu finden, wie z.B. *Shigella* oder *Rhizobium* (Troisfontaines *et al.* 2005). Das Typ III Sekretionssystem besteht aus 25 Proteinen und ist strukturell und funktionell eng mit dem Flagellenapparat verwandt (Cornelis *et al.* 2000).

Der *Yersinia secretion complex* (Ysc) besteht aus einem Basalkörper, der das Peptidoglykan sowie die innere und äußere Membran durchspannt, und einer nadelähnliche Struktur an der Bakterienoberfläche (Kubori *et al.* 1998; Hoiczky *et al.* 2001). Aufgrund dieser Struktur wird der Typ III Sekretionsapparat auch als Nadelkomplex oder Injektisom bezeichnet. Die Nadel besteht aus 200-300 6 kDa großen YscF-Untereinheiten, die polymerisiert eine helikale Struktur mit einer Länge von 600-800 Å und einem Innendurchmesser von ca. 25 Å bilden (Hoiczky *et al.* 2001). Die Länge der Nadel wird durch das Protein YscP präzise bestimmt und wird so angepasst, daß sie lang genug ist um die Anwesenheit einer Wirtszelle wahrzunehmen (Journet *et al.* 2003). Um die Effektorproteine ins Zytosol der Wirtszelle zu translozieren, reicht der nadelförmige Injektionsapparat alleine nicht aus. Dazu bedarf es eines sogenannten Translokationskomplexes, an der die Translokatorproteine YopB und YopD sowie das LcrV beteiligt sind, die sich an der Spitze der Nadel befinden (Mueller *et al.* 2005). Der Translokationskomplex öffnet die Zielzellmembran dort, wo die Nadel zur Injektion der Effektorproteine ansetzt (Marenne *et al.* 2003).

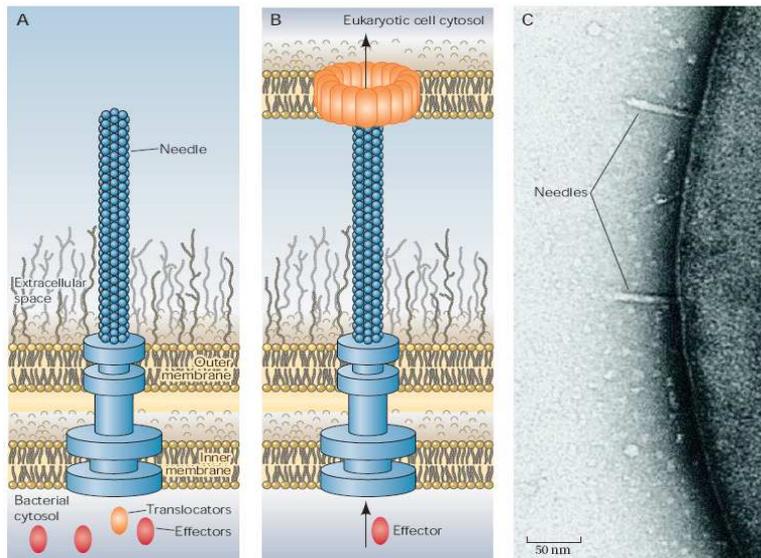


Abbildung 4: Darstellung des Typ III Sekretionssystems (Troisfontaines & Cornelis, 2005)

A Schematischer Aufbau des Sekretionsapparates, dessen basaler Teil die innere und äußere Membran sowie die dazwischenliegende Peptidoglykanschicht durchspannt, und die Nadel an der Bakterienoberfläche.

B Der Sekretionsapparat während der Translokation der Effektoren mit Translokationspore in der Wirtszelle.

C Elektronenmikroskopische Aufnahme der Nadeln des TTSS auf der Bakterienoberfläche.

A.3.2.3 Das Virulenz-Antigen (V-Antigen, LcrV)

Das Virulenz-Antigen, ein 37,5 k Da großes, multifunktionelles Protein, wurde 1956 durch Burrows entdeckt (Burrows 1956). Die besondere pathogenetische Bedeutung des LcrV begründet sich darauf, daß es sich in aktiven und passiven Immunisierungsexperimenten als protektives Antigen erwiesen hat (Motin *et al.* 1994; Leary *et al.* 1995; Hill *et al.* 1997; Roggenkamp *et al.* 1997; 1999). Es wurde gezeigt, daß das Protein LcrV ein Bestandteil des schützenden Impfstoffes gegen die Pest ist (Anisimov *et al.* 2004). LcrV ist ein sezerniertes Protein und ist als *lcrV* auf dem *lcrGVHYopBD* Operon des Virulenzplasmids aller drei humanpathogenen Yersinien codiert (Cornelis 1998). Das LcrV kann sich im Zytoplasma sowie auf der Oberfläche der Yersinien befinden und über das TTSS sezerniert werden (Fields *et al.* 1999a; Pettersson *et al.* 1999; Lee *et al.* 2000). Ferner gelangt das LcrV auch durch einen TTSS-unabhängigen Mechanismus in die Wirtszelle (Fields *et al.* 1999b).

Wie unter A.3.2.2 erwähnt, befindet sich das LcrV auch an der Spitze des Nadelkomplexes und spielt bei der Bildung einer Pore in der Wirtszellmembran eine wichtige Rolle. Zum einen reguliert LcrV die Synthese von YopB und YopD (Sarker *et al.* 1998) und zum anderen kann LcrV zusammen mit YopB (41,8 kDa) und YopD (33,4 kDa) eine Pore in eukaryotischen Membranen bilden (Neyt *et al.* 1999; Pettersson *et al.* 1999; Tardy *et al.* 1999; Holmstrom *et al.* 2001). Neben der Bildung des Nadelkomplexes spielt das LcrV, zusammen mit LcrG, auch eine regulatorische Rolle bei der Yop-Sekretion (Matson *et al.* 2001). Eine weitere Funktion des LcrV ist die Immunmodulation. LcrV kann mit TLR2-Molekülen interagieren und blockiert die allgemeine inflammatorische Antwort durch Induktion von IL-10, was zu einer Abnahme der TNF α und INF γ Produktion führt. Die Interaktion mit TLR2-Molekülen führt zur Aufnahme von LcrV in das Zytoplasma der Wirtszelle (rezeptorvermittelte Endozytose) (Nakajima *et al.* 1995; Sing 2005).

A.3.2.4 Yop Effektorproteine

Bei der Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 37 °C, bei Calciummangel und bei Kontakt der Yersinie mit einer Wirtszelle wird die Expression und Sekretion der Effektorproteine in das Zytoplasma induziert (Heesemann *et al.* 1986; Rosqvist *et al.* 1991; Sory *et al.* 1994). Bisher wurden sechs Yop (*Yersinia outer protein*)-Effektorproteine identifiziert, die in das Zytosol transloziert werden, um der angeborenen Immunantwort des Wirts zu entgehen: YopP, YopE, YopT, YopH, YopO und YopM (Cornelis 2002; Aepfelbacher *et al.* 2007; Trosky *et al.* 2008). Nach Translokation binden sie an verschiedenen Zellstrukturen, was zu Veränderungen der Signaltransduktion oder zu Zytoskeletumlagerungen führt. Die translozierten Yops YopE, YopT und YopO interagieren mit monomeren GTPasen der Rho-Familie, zu denen Rho, Rac und Cdc42 gehören, und wirken so anti-phagozytisch (Ruckdeschel *et al.* 1996).

YopE, ein 23 kDa großes Protein, besitzt zytotoxische Eigenschaften und interagiert insbesondere mit Rac, aber auch mit Rho und CDC42 (Black *et al.* 2000; Aepfelbacher 2004). YopE wirkt als GTPase aktivierendes Protein (GAP) und inaktiviert die GTPasen RhoA, CDC42 und Rac durch Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP (Von Pawel-Rammingen *et al.* 2000; Andor *et al.* 2001). Dies führt zur Depolymerisation von Aktin-Mikrofilamenten und folglich zur Abrundung und dem Ablösen der Zelle von der extrazellulären Matrix (Rosqvist *et al.* 1991).

YopT ist eine Cysteinprotease, die von Rho, Rac und Cdc42 den C-terminalen Geranyl-Geranyl-Cysteinrest abspaltet (Shao *et al.* 2002) und zur Freisetzung von Rho GTPasen von der Plasmamembran führt (Zumbihl *et al.* 1999; Sorg *et al.* 2001). YopT wirkt zytotoxisch und führt zur Zerstörung des Aktinzytoskelettes durch die Depolymerisierung des Aktins (Iriarte *et al.* 1998).

YopO ist eine autophosphorylierende Serin/Threonin-Kinase die durch Aktin induziert wird (Juris *et al.* 2002). Desweiteren bindet YopO an die GTPasen RhoA und Rac1, wirkt aber nicht als GAP (Barz *et al.* 2000; Dukuzumuremyi *et al.* 2000). Die genaue Wirkung von YopO auf die zellulären Funktionen der Wirtszelle ist allerdings nach wie vor nur unvollständig bekannt.

YopH ist eine 51 kDa große Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP), deren katalytische Domäne eine ähnliche Struktur wie die der eukaryotischen Protein-Tyrosin-Phosphatasen hat und zu einer der aktivsten bekannten PTPasen zählt (Guan *et al.* 1990; Zhang *et al.* 1992). YopH dephosphoryliert Proteine des fokalen Adhäsionskomplexes wie Paxillin, FAK (focal adhesion kinase) und p130^{Cas}. Dadurch werden adhäsionsregulierte Signalwege unterbrochen und der Phagozytose entgegen gewirkt (Fallman *et al.* 1997; Hamid *et al.* 1999). Ferner verhindert YopH den „oxidativen Burst“ von Makrophagen (Bliska *et al.* 1995). Des Weiteren konnte für YopH die Unterdrückung der B- und T-Zell Aktivität nachgewiesen werden (Yao *et al.* 1999).

YopP und **YopM** besitzen keinen Einfluß auf die Hemmung der Phagozytose.

YopP vermittelt einen wichtigen immunmodulatorischen Effekt. YopP ist eine Acetyltransferase (Mukherjee *et al.* 2006), die in Makrophagen (Monack *et al.* 1997) und DCs (Erfurth *et al.* 2004) den

programmierten Zelltod auslöst, nicht aber in anderen Zelltypen (Mills *et al.* 1997; Monack *et al.* 1997). Die Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK; ERK1 und ERK2, JNK, p38) wird blockiert, wodurch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB („cAMP-response-binding“), der an der Immunantwort beteiligt ist, inhibiert wird (Meijer *et al.* 2000). YopP hemmt die Kinase IKK β , die den NF- κ B Inhibitor I κ B phosphoryliert. Dadurch wird die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Nukleus verhindert, und somit wird die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α durch Makrophagen und IL-8 durch Endothelzellen unterdrückt (Boland *et al.* 1998; Ruckdeschel *et al.* 1998; Schesser *et al.* 1998; Orth *et al.* 1999). Durch die Verringerung der Entzündungsmediatoren wird die Aktivierung der Immunantwort verzögert und damit auch die Elimination der Yersinien (Ruckdeschel *et al.* 1998). Die Ursache für die induzierte Apoptose ist vermutlich der Verlust von NF- κ B (Ruckdeschel *et al.* 2001) und der MAP Kinase Aktivität (Zhang *et al.* 2005).

Der Effektor **YopM** besteht aus 13-20 *leucin-rich-repeats* (LRRs) mit einer Länge von je etwa 20 bzw. 22 Aminosäuren (Kobe *et al.* 2001). Aus vier YopM-Monomeren bildet sich ein zylindrisches Tetramer mit einem Innendurchmesser von 35 Å (Evdokimov *et al.* 2001). Bisher konnte diesem Yop keine enzymatische Aktivität zugewiesen werden, aber dennoch ist YopM ein essentieller Virulenzfaktor bei der Infektion von Mäusen (Mulder *et al.* 1989; Leung *et al.* 1990). Es gelangt über einen vesikelassoziierten Transport in den Zellkern (Skrzypek *et al.* 1998; Benabdillah *et al.* 2004), wo es die Transkription verschiedener Gene, welche mit dem Zellzyklus und dem Zellwachstum assoziiert sind, beeinflusst (Sauvonnet *et al.* 2002). Außerdem bildet YopM mit den Kinasen PRK2 und RSK1 einen Proteinkomplex (McDonald *et al.* 2003), wodurch diese aktiviert werden. Weiterhin beeinflusst YopM die angeborene Immunantwort und führt zur Depletion von NK-Zellen (Kerschen *et al.* 2004).

Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der Wirkungsweise der translozierten Yops auf die Zielstrukturen der Wirtszelle.

Tabelle 1: translozierte Yop Effektorproteine, ihre Eigenschaften und Wirkungsweisen

Yop Effektorprotein	Molekulargewicht in kDa	Interaktion mit Zellstrukturen/ enzymatische Aktivität	Funktion
Yop E	22,9	GTPase aktivierendes Protein	Phagozytosehemmung
Yop T	35,3	Cysteinprotease Modifiziert die GTPasen RhoA, Rac und CDC42	Phagozytosehemmung

Yop O	81,7	Serin/ Threonin-Kinase Phosphorylierung von Aktin	Phagozytosehemmung
Yop H	51	Protein-Tyrosinphosphatase Dephosphoryliert FAK und p130 ^{Cas}	Phagozytosehemmung
Yop P	32,5	Hemmung von MAPK und NFκB Signalkaskaden → Cysteinprotease → Acetyltransferase	Immunsuppressive Aktivität, Apoptose bei Makrophagen und DC
Yop M	60,1	Proteinkomplex mit PRK2 und RSK1	Suppression von NKs

Neben den oben genannten Yop Effektorproteinen werden auch weitere Proteine wie YopB, YopD, YopN und YopQ sekretiert.

YopN hat offenbar ausschließlich regulatorische Funktionen auf den Export der Effektorproteine. Es ist auf der Bakterienoberfläche lokalisiert und bildet in Anwesenheit von Ca²⁺ mit TyeA eine Art Verschlußstopfen des Sekretionskanals (Boland *et al.* 1996; Cornelis 2002).

YopB und **YopD** bilden wie unter A.3.2.3 angemerkt mit LcrV eine Pore in der Wirtszellmembran, so daß die Effektor-Yops in die Zielzelle transloziert werden können (Cornelis 2002; Mueller *et al.* 2005).

YopQ wird synthetisiert und ins extrazelluläre Medium sekretiert, wenn die Konzentration von Calcium in der Umgebung kleiner 80 µM beträgt (Anderson *et al.* 1999). Möglicherweise kontrolliert es die Translokation der Yop Effektorproteine. Dafür spricht, daß bei einer YopK Mutante (YopQ-Analogon in *Y. pseudotuberculosis*) eine Hypertranslokation von Yop Proteinen in das Zytosol eukaryotischer Zellen nachgewiesen werden konnte (Holmstrom *et al.* 1997).

A.3.2.5 Translokation von Yops

Der für die Yop-Translokation natürliche Stimulus ist der Kontakt mit einer eukaryotischen Wirtszelle. Für die Translokation der Effektoren spielen LcrV sowie YopD und YopB eine wichtige Rolle, da sie die Translokationspore nach der Adhärenz der Yersinien an die Wirtszelle etablieren,

wodurch die Translokation erst ermöglicht wird (Rosqvist *et al.* 1994; Persson *et al.* 1995; Hakansson *et al.* 1996; Pettersson *et al.* 1999; Holmstrom *et al.* 2001). Dabei ist LcrV für die korrekte Einlagerung von YopD und YopB in die Zielmembran wichtig (Cornelis *et al.* 1997; Goure *et al.* 2005). Zudem wird die Blockade des Sekretionskanals durch YscG, TyeA, YopN aufgehoben. Für den Transport durch den Sekretionskanal sind für die Effektorproteine YopT, YopE, YopO und YopH Chaperone notwendig. Für die Effektoren YopP und YopM wurde bisher kein spezifisches Chaperon identifiziert. Die Chaperone bilden mit ihren zugehörigen Yops einen Komplex, um mit Komponenten des Transportkanals zu interagieren. Die ATPase YscN entfernt unter ATP-Hydrolyse das Chaperon vom Yop, wodurch anschließend die Entfaltung und der Transport des Yops in die Wirtszelle erfolgen. Dort erlangt der Effektor wieder seine natürliche Konformation und kann seine Funktion ausüben (Jackson *et al.* 2000; Cornelis 2006).

A.3.3 *Yersinia enterocolitica* als Lebendvektor

Der Großteil humanpathogener Mikroorganismen gelangt über mukosale Oberflächen in den Körper. Die mukosale Infektion führt zu einer zellvermittelten Immunität in Form von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten. Des Weiteren führt eine Infektion mit *Y. enterocolitica* in der Maus zu einer humoralen Immunantwort (Gaede *et al.* 1995; Igwe *et al.* 1999). Neben der Bildung von Serumantikörpern konnten auch *Yersinia* spezifische sekretorische Immunglobulin A-Moleküle im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge nachgewiesen werden (Van Damme *et al.* 1992). Es wurde gezeigt, daß der Transfer von *Yersinia* spezifischen Immunglobulinen aus Seren infizierter Mäuse einen Schutz gegen eine üblicherweise letal verlaufende *Yersinia* Infektion vermittelt (Vogel *et al.* 1993; Roggenkamp *et al.* 1997; Igwe *et al.* 1999). Ferner ist die T-Zell abhängige zelluläre Immunantwort ein entscheidender Faktor bei der Elimination des Erregers (Autenrieth *et al.* 1992; 1994; Kempf *et al.* 1998). Um einen optimalen, langlebigen Schutz vor Infektionen zu erzielen, ist die Stimulierung einer mukosalen und systemischen Immunantwort von Nöten.

Mittels attenuierten Mikroorganismen, die als orale Lebendvakzine eingesetzt werden, wird versucht, Schutz vor intrazellulären Erregern zu vermitteln (Cirillo *et al.* 1998; Shata *et al.* 2000; van Ginkel *et al.* 2000). Dazu werden heterologe Antigene fremder Erreger durch *Yersinia* in die Wirtszelle transloziert. So wurde für verschiedene Fusionen des Effektorproteins YopE mit bakteriellen Antigenen die Induktion einer spezifischen Immunantwort beschrieben (Rüssmann *et al.* 2003). Ferner zeigten *in vitro* Untersuchungen, daß YopE als Transporter genutzt werden kann, um Fremdanigene in das Zytosol von eukaryotischen Zellen zu bringen (Sory *et al.* 1995; Schesser *et al.* 1996; Rüssmann *et al.* 2000). Für eine effektive Translokation eines heterologen Antigens in das Zytosol eukaryotischer Zellen sind die N-terminalen Aminosäuren 1-50 erforderlich. Diese beinhalten die Bindungsstelle für das YopE spezifische Chaperone (SycE), welches für die Faltung und den Transport von YopE verantwortlich ist (Sory *et al.* 1995; Schesser *et al.* 1996; Lee *et al.* 1998; Rüssmann *et al.* 2000).

Das immunogene Potential von YopE Fusionsproteinen wird *in vivo* sowohl für rekombinante *Y. pseudotuberculosis* als auch für *Y. enterocolitica* bestätigt. So löst eine *Y. pseudotuberculosis yopK* Mutante oder eine *Y. enterocolitica yopP*-Mutante, die das YopE1-138/LLO Fusionsprotein transloziert, in oral infizierten Mäusen eine Antigen-spezifische CD4 und CD8 T-Zellantwort aus und vermittelt dadurch einen Schutz gegen eine *Listeria monocytogenes* Wildtyp Infektion (Rüssmann *et al.* 2003; Trülzsch *et al.* 2005).

In vielen Studien konnte für die Yop Effektorproteine eine zentrale Stellung für die Virulenz und die Modulation der Immunantwort nachgewiesen werden. Die Deletion des *yopP*-Gens zeigte einen möglichen Ansatz für die Entwicklung eines *Y. enterocolitica* basierten Impfstammes. Eine weitere Attenuierung dieser *Y. enterocolitica yopP*-Mutante bei gleichzeitig gutem immunogenen Potential ist die Herausforderung.

A.4 *Listeria monocytogenes* als Infektionsmodell

L. monocytogenes ist ein gram-positives, fakultativ intrazelluläres Bakterium, das Infektionen in immunsupprimierten, älteren oder schwangeren Personen verursachen kann. Über kontaminierte Lebensmittel wie z.B. Rohmilchprodukte aufgenommen, kann es zu Krankheiten wie Enzephalitis, Meningitis oder zu Totgeburten führen.

Listerien werden in der Maus nach i.v.-Injektion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in Milz und Leber phagozytiert, wodurch ein großer Anteil der Listerien eliminiert wird. Einige Listerien entkommen aus dem Phagosom durch das Listeriolysin O (LLO), ein porenformendes Toxin, und gelangen so in das Zytosol der Wirtszelle (Harty *et al.* 2000). Im Zytosol können sich die Listerien vermehren und benutzen die Aktinfilamente der Wirtszelle als Transportmittel, um von einer Zelle zur anderen zu gelangen. Auf diese Weise müssen die Bakterien den intrazellulären Raum nicht verlassen und sind somit vor Antikörpern und dem Komplementsystem geschützt (Cossart 2002).

Oft reicht die Immunantwort des angeborenen Immunsystems nicht, um die Bakterien bei einer Primärinfektion komplett zu eliminieren. Können sich die Listerien im Zytosol der Wirtszelle vermehren, sekretieren sie eine Vielzahl von Proteinen ins Zytosol, welche anschließend über den MHC-Klasse I-Weg auf der Oberfläche der APCs präsentiert werden, wodurch nach einigen Tagen die adaptive Immunantwort einsetzt (Brunt *et al.* 1990). Somit ist die adaptive Immunantwort nach einer Primärinfektion durch eine dominante MHC-Klasse I vermittelte CD8-Antwort gekennzeichnet, die eine komplette Eliminierung der Listerien und einen lebenslangen Schutz ermöglicht. Das immundominante Epitop der MHC-Klasse I ist das LLO₉₁₋₉₉-Epitop, welches über das H-2K^d MHC-Klasse I-Molekül der BALB/c-Mäuse präsentiert wird (Vijh *et al.* 1997).

Bei *L. monocytogenes* handelt es sich um ein sehr gut untersuchtes Infektionsmodell für intrazelluläre Bakterien, dessen induzierte Immunantworten ebenfalls gut charakterisiert sind. Viele Studien haben

gezeigt, daß LLO ein protektives Antigen im Listeriose-Mausmodell darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante Yersinien, die ein *Listeria*-Epitop exprimieren, bzw. ein LLO-Fusionsprotein verwendet, um eine Immunität gegen Listerien-Infektionen zu erzielen. So diente eine Listerien-Infektion der Überprüfung eines Schutzes und somit der Wirksamkeit des Impfstoffes.

A.5 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit befasst sich im Rahmen des DFG Schwerpunktprogrammes „Neue Vakzinierungsstrategien“ mit der Weiterentwicklung eines oralen *Y. enterocolitica* Lebendimpfstoffträgers. Dabei soll der Einfluss der Yop Effektorproteine des Typ-III-Sekretionssystems auf die Immunantwort im Mausinfektionsmodell untersucht werden.

Da YopP die Apoptose induziert sowie das Priming von CD8 T-Zellen inhibiert, sollen in *yopP*-Mutanten weitere Yops ausgeschaltet werden, um deren Effekt besser studieren zu können. Ferner war es Ziel dieser Arbeit, die Eignung dieser Doppelmutanten als Lebendimpfstoffes zu untersuchen.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Totimpfstoffes basierend auf dem LcrV von *Y. enterocolitica*. Hier sollte das Potential des LcrVs als Adjuvans und Antigentranslokator bestimmt werden.

Im Einzelnen sollten folgende Punkte bearbeitet werden:

1. Herstellung von *yop* Deletionsdoppelmutanten, basierend auf der *yopP*-Deletionsmutante
2. Untersuchung des Einflusses multipler Yops auf die Antigenpräsentation
3. Virulenzstudien der *yop* Deletionsmutanten im oralen und intravenösen Mausinfektionsmodell
4. Untersuchung der zellulären Immunantwort auf ein transloziertes *Listeria* Antigen nach oraler Immunisierung mit *yop* Deletionsmutanten
5. Untersuchung des vermittelnden Schutzes gegen eine *Listeria monocytogenes* Wildtyp Infektion nach Immunisierung mit *Yersinia*-Mutanten
6. Entwicklung eines Totimpfstoffes auf LcrV-Basis
7. Untersuchung der zellulären Immunantwort auf den LcrV-basierten Impfstoff
8. Untersuchung des Schutzes gegen eine *Listeria monocytogenes* Wildtyp Infektion nach Immunisierung mit LcrV-Fusionsproteinen

B MATERIAL UND METHODEN**B.1 Material****B.1.1 Geräte**

In Tabelle 2 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Geräte	Modell	Firma
Analysenwaage	R160P, Pt 1200	Sartorius, Göttingen
Blot-Apparatur	Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
CO ₂ -Inkubator	BBD 6220	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Typ B 20	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern für SDS-PAGE	Mini-PROTEAN 3 SE400	Bio-Rad, München Hofer Scientific, San Francisco
Elektroporationsgerät	GenePulser II Pulse Controller II ECM399	Bio-Rad, München Bio-Rad, München BTX (Genetronics), San Diego
Elektrophoresekammern für Agarosegele		Kreutz
French Press	French Pressure Cell 40K	SLM Aminco, Silver Springs
Fermenter	Biostat B 51	B. Braun Biotech, Melsungen
Gel-Dokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad, München
Heizblock	Typ 50126101	Liebisch, Bielefeld
Mixer	Thermomixer 5436 Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
PCR-Cycler	GeneAmp, PCR System 2400 Unocycler	Perkin Elmer, Waltham VWR, Darmstadt
pH-Meter	320 pH-Meter	Mettler, Toledo
Photometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Pipetten	Pipetman P2-P1000 8-Kanal 30-300 µl	Gilson, Bad Camberg Eppendorf, Hamburg

Schüttelinkubator	Certomat BS-1 Excella E24	B. Braun Biotech, Melsungen New Brunswick, Nürtingen
Schwingmühle	MM2000	Retsch, Haan
Proteinaufreinigungssystem	ÄKTA Explorer	Amersham Pharmacia Biotech, München
Spannungsquellen	Power Pac 200 und 300	Bio-Rad, München
Sterilwerkbank	HeraSafe HS 12	Heraeus, Hanau
Tank-Blot-Kammer		BioRad, München
Transilluminator	UVT-20M/W	Herolab, Wiesloch
Waage	Kern KB, Kern PLS 10-3	Kern & Sohn, Balingen
Wasserbad	WB/OB7-45	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Eppendorf 5417C Varifuge 3.OR Sorvall RC5C	Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau Kendro, Langenselbold

B.1.2 Bezugsquellen für Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien und Antibiotika über die Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Enzyme wurden bei Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt am Main) gekauft.

Verwendete Nährmedien wurden von der Firma Difco Becton Dickinson (Detroit) und Merck (Darmstadt) bezogen; Zellkulturmedien und deren Zusätze von Invitrogen (Karlsruhe) und PAN Biotech (Aidenbach).

Standardantikörper stammten von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Biosource (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Nitrozellulose-Membran wurde von Schleicher & Schüll (Daßel) bezogen und Plastikverbrauchsmaterial von den Firmen Brand (Wertheim), Eppendorf (Hamburg), Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) und Millipore (Schwalbach).

Spezielle Chemikalien und Biochemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Tabelle 3: Bezugsquellen für Chemikalien

Chemikalie	Firma
Agar	Becton Dickinson, Detroit
Agarose	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf

Benzonase	Merck Biosciences, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
BugBuster	Novagen, Darmstadt
CD11c (N418) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Ciprofloxacin - Hydrochlorid	MP Biomedicals, Heidelberg
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GM-CSF	R&D Systems, Wiesbaden
Hefeextrakt	MP Biomedicals; Eschwege
HEPES	Gibco, Karlsruhe
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden
LLO-Peptide	Genscript, Piscataway USA
Primer	biomers.net, Ulm Metabion, Martinsried Thermo Scientific, Karlsruhe
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe
Protogel (Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %))	Serva, Heidelberg
Sulfo-EGS	Perbio Science, Bonn
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
Yersinia-Selektiv-Agar (CIN)	Oxoid, Wesel

B.2 Bakteriologische Arbeiten

B.2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Primer

B.2.1.1 Bakterienstämme

In Tabelle 4 und Tabelle 5 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme und Zelllinien aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete *Y. enterocolitica*-Stämme

Stamm	Beschreibung ^a	Referenz/Quelle
<i>Y. enterocolitica</i>		
WA-314	Serotyp 0:8, mit pYV Plasmid	(Heesemann <i>et al.</i> 1983; Cornelis 2002)
WA-C	Plasmid-loses Derivat von WA-314	(Heesemann <i>et al.</i> 1983)
WA-C(pYV::CM)	pYV Plasmid enthält Cm ^r -Kassette in nicht codierender Region	(Trülsch <i>et al.</i> 2004)

WA-C(pTTSS)	Exprimiert T3SS und YadA aber keine Effektor-Yops, Chaperone und ORFs, SH ^r	(Trülsch <i>et al.</i> 2003)
ΔYopP	WA-C mit pYVΔyopP, Kan ^r	(Trülsch <i>et al.</i> 2004)
ΔYopO	WA-C mit pYVΔyopO, Kan ^r	(Trülsch <i>et al.</i> 2004)
ΔYopH	WA-C mit pYVΔyopH, Kan ^r	(Trülsch <i>et al.</i> 2004)
ΔYopP-Cm ^r	WA-C mit pYVΔyopP, yopP-Gen ersetzt durch <i>TnMax25</i>	(Trülsch <i>et al.</i> 2004)
ΔYopE	WA-C mit pYVΔyopE, Kan ^r	(Trülsch <i>et al.</i> 2004)
ΔYopM	WA-C mit pYVΔyopM, Kan ^r	(Trülsch <i>et al.</i> 2004)
ΔYopT	WA-C mit pYVyopT, Kan ^r	(Trülsch <i>et al.</i> 2004)
ΔYopQ	WA-C mit pYVyopQ, Kan ^r	(Trülsch <i>et al.</i> 2004)
WA-C(pYVLcrV _{K42Q})	Lysin 42 des LcrV ersetzt durch Glutamin	(Sing <i>et al.</i> 2005)
ΔPH	ΔYopP-Cm ^r , yopH ersetzt durch Kan ^r	diese Arbeit
ΔPO	ΔYopP-Cm ^r , yopO ersetzt durch Kan ^r	diese Arbeit
ΔPLcrV _{K42Q}	ΔYopP-Cm ^r , Lysin 42 des LcrV ersetzt durch Glutamin	diese Arbeit
ΔPE	ΔYopP-Cm ^r , yopE ersetzt durch Kan ^r	diese Arbeit
ΔPM	ΔYopP-Cm ^r , yopM ersetzt durch Kan ^r	diese Arbeit
ΔPT	ΔYopP-Cm ^r , yopT ersetzt durch Kan ^r	diese Arbeit
ΔPQ	ΔYopP-Cm ^r , yopQ ersetzt durch Kan ^r	diese Arbeit

^a: Cm^r: Chloramphenicolresistenz, Kan^r: Kanamycinresistenz, SH^r: Spectinomycinresistenz

Tabelle 5: Verwendete *E. coli*- und *L. monocytogenes* -Stämme

Stamm	Beschreibung / Genotyp ^a	Referenz/Quelle
<i>E. coli</i>		
DH5α	F ⁻ , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA</i> , Δ <i>lacU169</i> (φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>)	(Hanahan 1983)
BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> , λ(DE3), <i>endA</i> , Hte, [<i>argU ileY leuW</i> Cm ^r]	Stratagene, La Jolla
BL21-msbB	BL21-CodonPlus (DE3)-RIL mit Δ <i>msbB</i> (Gen ersetzt durch Kan ^r)	diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i>		
	sv 1/2a EGD	(Kohler <i>et al.</i> 1990)

^a: Genotypbezeichnungen für *E. coli* siehe Bachmann (1990)

Cm^r: Chloramphenicolresistenz, Kan^r: Kanamycinresistenz, Tet^r: Tetrazyklinresistenz

B.2.1.2 Plasmide

Eine Übersicht über die verwendeten Klonierungs- und Expressionsvektoren sowie die rekombinanten Plasmide geben Tabelle 6 und Tabelle 7.

Tabelle 6: Verwendete Vektoren

Plasmid	relevante Eigenschaften	Größe (kb)	Referenz/Quelle
pACYC184	Klonierungsvektor, Cm ^r , Tet ^r	4,2	(Chang <i>et al.</i> 1978)
pACYC177	Klonierungsvektor, Kan ^r , Amp ^r	3,9	(Chang <i>et al.</i> 1978)
pGEM-T easy	Klonierungsvektor, <i>lacZ</i> , T7-Promotor, SP6-Promotor, T-Überhang, Amp ^r	3,0	Promega, Mannheim
pMBL-T/A	Klonierungsvektor, f1 ori, P _{lac} , T-Überhang, Amp ^r	3,0	Genaxxon, Biberach
pET-21b	Expressionsvektor, T7-Promotor, C-terminaler His ₆ -„Tag“, Amp ^r	5,4	Novagen, Darmstadt
pKD46	Red System: Rekombinasen <i>redA</i> und <i>redβ</i> , Exonucleaseinhibitor <i>redγ</i> , <i>ParaB</i>		(Datsenko <i>et al.</i> 2000)

Erläuterung: Amp^r: Ampicillinresistenz, Kan^r: Kanamycinresistenz, Tet^r: Tetrazyklinresistenz

Tabelle 7: Rekombinante Plasmide

Plasmid	Relevantes Merkmal ^a	Referenz-Quelle
pHR430	<i>yopE</i> ₁₋₁₃₈ LLO ₅₁₋₃₆₃ <i>M45</i> PCR-Fragment in EcoRV-SalI Schnittstelle von pACYC184	(Rüssmann <i>et al.</i> 2003)
pHR430SH	pHR430 mit SH-Resistenz anstelle von Cm ^r	diese Arbeit
pVL	Lcr-Operon + LcrV-LLO ₇₅₋₃₀₆ auf pACYC184	diese Arbeit
pTTSS	pYV-Plasmid mit T3SS, aber ohne Yops, Chaperone und Orfs	(Trülsch <i>et al.</i> 2003)
pYV ΔP	<i>yopP</i> Gen ersetzt durch <i>yopP::TnMax25</i> (Cm ^r)	(Trülsch <i>et al.</i> 2004)
pYV ΔPE	<i>yopP</i> Gen ersetzt durch <i>yopP::TnMax25</i> , Kan ^r -Kassette im <i>yopE</i> Gen	diese Arbeit
pYV ΔPH	<i>yopP</i> Gen ersetzt durch <i>yopP::TnMax25</i> , Kan ^r -Kassette im <i>yopH</i> Gen	diese Arbeit
pYV ΔPT	<i>yopP</i> Gen ersetzt durch <i>yopP::TnMax25</i> , Kan ^r -Kassette im <i>yopT</i> Gen	diese Arbeit
pYV ΔPM	<i>yopP</i> Gen ersetzt durch <i>yopP::TnMax25</i> , Kan ^r -Kassette im <i>yopM</i> Gen	diese Arbeit
pYV ΔPO	<i>yopP</i> Gen ersetzt durch <i>yopP::TnMax25</i> , Kan ^r -Kassette im <i>yopO</i> Gen	diese Arbeit
pYV ΔPQ	<i>yopP</i> Gen ersetzt durch <i>yopP::TnMax25</i> , Kan ^r -Kassette im <i>yopQ</i> Gen	diese Arbeit
pYV ΔPLcrV _{K42Q}	<i>yopP</i> Gen ersetzt durch <i>yopP::TnMax25</i> , K42Q Punktmutation im LcrV	diese Arbeit
pET-LcrV-LLO	pET-21b mit LcrV und LLO ₇₅₋₃₀₆ PCR-Fragmente in <i>NdeI-SstI-HindIII</i> Schnittstellen, Amp ^r	diese Arbeit
pET-LcrV _{K42Q} -LLO	wie pET-LcrV-LLO, nur mit K42Q punktmutiertem LcrV	diese Arbeit
pET-LcrV	pET-21b mit LcrV PCR-Fragment in <i>NdeI-SstI</i> Schnittstellen, Amp ^r	diese Arbeit
pET-LLO-Kontr.	pET-21b mit LLO ₇₅₋₃₀₆ PCR-Fragment in <i>SstI-HindIII</i> Schnittstellen und zusätzlicher Base, Amp ^r	diese Arbeit

^a: Phänotypbezeichnung: Amp^r: Ampicillinresistenz, Kan^r: Kanamycinresistenz, Strep^r: Streptomycinresistenz

B.2.1.3 Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet. Je nach Experiment wurden die Primer der Firma Metabion bzw. biomers.net (entsalzt und lyophilisiert; für Screening und Klonierung) oder bei Thermo Scientific (entsalzt, lyophilisiert und HPLC-gereinigt; für ET-Cloning) verwendet. Die Konzentration wurde durch lösen in H₂O_{bidest.} auf 100 pmol/μl eingestellt.

Tabelle 8: Verwendete Primer

Primer	Primersequenz (5' – 3')	Schnittstelle
LcrV_NdeI_for	CTCTCTCATATGATTAGAGCCTACGAACAAAAC	<i>NdeI</i>
LcrV_SstI_rev	CTGGAGCTCCCTCGTGTCATCTAGCAGAC	<i>SstI</i>
LLO for	GAGCTCGTGCCGCCAAGAAAAGGTTATAAAGA TGG	<i>SstI</i>
LLO rev	CTAAGCTTACTAATGACTTCTTCTTGCATTTTCC CTTCAC	<i>HindIII</i>
LLO_Kontr_for	GAGCTCGGTGCCGCCAAGAAAAGGTTATAAAG ATGG	<i>SstI</i>
Lcr_Operon for	CAGTAGGGATCCCTGTATGGCAATGTCGATGTA CTGGC	<i>BamHI</i>
Lcr_Operon rev	CAGTAGGCATGCCATATTAATAAATTTGCCCTC GCATCA	<i>SphI</i>
LcrV_Sph_for	CTGCATGCATGCATTAGAGCCTACGAACAAAA CCCACAACATTTTATTG	<i>SphI</i>
LLO_Sal-rev	ATGCAGGTCGACACTAATGACTTCTTCTTGCAT TTCCCTTCAC	<i>SalI</i>
msbB_ET_Kan for	ATGGAAACGAAAAAAAAATAATAGCGAATACAT TCCTGAGTTTGATAAATCCTCACTGACACCCTCA TCAGTG	
msbB_ET_Kan rev	TTATTTGATGGGATAAAGATCTTTGCGCTTATAC GGCTGGATTCGCCCCGGCGTCAAGTCAGCGTAA TGCTC	
msbB_screen for	ATGGAAACGAAAAAAAAATAATAGCGAATAC	
msbB_screen_WT rev	AATCTCGACTTCTTCATTCATCCG	
msbB_screen_KO rev	CGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCA	
Yop P-ET-for	CCACTACTGATTCAACTTGGACGAAG	
Yop P-ET-rev	GGGAAAGAACTGGCGATGCTC	
Yop E-ET-for	GCTATTTTCCCACTAAGATAACCTTGTTTTAATA GCCAAGGGAATAAATAGTCGAAGTTCCTATTCT CTAGAAAGTATAGGAACTTCTAAGATGATCTTC TTGAGATC	
Yop E-ET-rev	TCAGGCGTTTTAAGGCTGAAAAGTGTC AACCTA TAGCAGGACTAGTCACCATAGAAGTTCCTATTTC TCTAGAAAGTATAGGAACTTCAACAACCAATTA CCAATTCTG	
Yop T-ET-for	TCAATTTATCGGTATAGCAAATAATGGCTAAC ATAAATAGATTATACAGGAAGTTCCTATTCTCT AGAAAGTATAGGAACTTCTAAGATGATCTTCT GAGATC	
Yop T-ET-rev	GCCAAGCTTCAGGAAAAGCTGTTGCATAAGTTC TGTGAAGGTTGTCTGCAAAGTTCCTATTCTCTA GAAAGTATAGGAACTTCAACAACCAATTAACCAA	

	TTCTG
Yop H-ET-for	TAGTATAGGCGTGATTTAATTAGTTCTTAATTT AATTAAGGAGGGAAGCGAAAGTATAGGAACTT CTAAGATGATCTTCTTGAGATC
Yop H-ET-rev	AGCGTATATATCTTAGTAATTTTATTTACTCATA GGAATAAATATTTACAGAAAGTATAGGAACTTC ACAACCAATTAACCAATTCTG
Yop O-ET-for	AATCTTAGCCATTCTCGGATATATCAACTCAA GGCTTAGGGGGCACTTGGAAGTTCCTATTCTCT AGAAAGTATAGGAACTTCACAACCAATTAACCA ATTCTG
Yop O-ET-rev	CCCTCTTACTCAATCTACTCAATCGGTTATTAAA TGGGGATGAGTAAAGCGAAGTTCCTATTCTCTA GAAAGTATAGGAACTTCTAAGATGATCTTCTTG AGATC
Yop M-ET-for	ACGTTGTAATGATATTTAACGTGACGCAGAATT ATGAACGCTCTTGCGTAGAAGTTCCTATTCTCTA GGAAAGTATAGGAACTTCTAAGATGATCTTCTT GAGATC
Yop M-ET-rev	GTTTTTTTGA AAAAACCCGATAATAAAAACATT TTCAGAAAGGCATTCAATGAAGTTCCTATTCTCT AGAAAGTATAGGAACTTCACAACCAATTAACCA ATTCTG
Yop Q-ET-for	GACGGTTATTAATAGTG TAGTTTATAAAGTAA ATTTTGGAGTAGTA ACTGAAGTTCCTATTCTCTA GAAAGTATAGGAACTTCTAAGATGATCTTCTTG AGATC
Yop Q-ET-rev	TTAACCTTTAACATAATCAACTATCATATCCCAA ACTCTTTAATATAGCTGAAGTTCCTATTCTCTAG AAAGTATAGGAACTTCACAACCAATTAACCAAT TCTG

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind durch die fettgedruckten Basen gekennzeichnet.

B.2.2 Nährmedien, Antibiotika und Medienzusätze

B.2.2.1 Nährmedien

Die Sterilisation der verwendeten Nährlösungen für Bakterien erfolgte durch Autoklavieren (121°C, 1 bar Überdruck, 20 min). Die Herstellung von festen Nährböden wurde durch den Zusatz von 16 g Agar pro Liter zu der entsprechenden Nährlösung erreicht. Der Agar wurde durch Erhitzen aufgeschmolzen und in Petrischalen gegossen. Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium, die Anzucht von *Y. enterocolitica* und *L. monocytogenes* in BHI-Medium.

Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	5 g NaCl

	ad 1 l H ₂ O _{dest}
	pH 7,4 – 7,6 mit NaOH einstellen
Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium	37 g BHI ad 1 l H ₂ O _{dest}
PALCAM-Listeria-Selective-Agar (von Merck)	35,9 g PALCAM Agar ad 500 ml H ₂ O _{dest} Nach dem Autoklavieren wird ein Fläschchen „PALCAM Listeria Selective Supplement“ in 1 ml H ₂ O _{dest} gelöst und dem abgekühlten Agar (unter 50°C) zugegeben.
Yersinia-Selektivagar (CIN-Nährboden)	fertige Platten wurden von Oxoid (Wesel) bezogen
Einfriermedium	LB- oder BHI-Medium mit 20% Glycerin als Zusatz

Als Transformationsmedium wurde reichhaltiges SOC-Medium verwendet.

SOC-Medium	10 g Trypton 2,5 g Hefe 0,3 g NaCl 0,1 g KCl ad 490 ml H ₂ O _{dest} . nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 20 mM Glukose sowie je 5ml einer 1M MgCl ₂ -Lösung und einer 1M MgSO ₄ -Lösung (alle Lösungen wurden steril filtriert) zugesetzt.
-------------------	--

B.2.2.2 Antibiotika und Medienzusätze

Die Selektion von Bakterienstämmen erfolgte mit Hilfe verschiedener Antibiotika-Resistenzen.

Tabelle 9 zeigt die verwendeten Antibiotika und Medienzusätze. Antibiotika wurden als Stammlösungen angesetzt, steril filtriert (0,22 µm Sterilfilter von Millipore, Schwalbach) und bei -20°C gelagert. Stammlösungen wurden den Nährmedien nach Abkühlen auf weniger als 55°C zugegeben.

Tabelle 9: Verwendete Antibiotika und andere Zusätze

Antibiotika	Lösungsmittel	Stammlösung mg/ml	Endkonzentration µg/ml
Ampicillin (Amp)	H ₂ O _{dest} .	100	100
Carbenicillin (Carb)	50 % Ethanol	100	100

Chloramphenicol (Cm)	70 % Ethanol	25	25
Ciprofloxacin (Cip)	H ₂ O _{dest.} , alkalisch	15	-
Gentamicin (Gm)	H ₂ O _{dest.}	50	50
Kanamycin (Kan)	H ₂ O _{dest.}	50	50
Spectinomycin (SH)	H ₂ O _{dest.}	50	50
Tetrazyklin (Tet)	70 % Ethanol	20	20
Zusätze			
CaCl ₂	H ₂ O _{dest.}	500mM	0,5 mM
EGTA	H ₂ O _{dest.}	500 mM	5 mM
Glukose	H ₂ O _{dest.}	20 %	0,2 %
L-Arabinose	BHI-Medium	20%	0,2 %
IPTG	H ₂ O _{dest.}	1 M	1 mM
MgCl ₂	H ₂ O _{dest.}	1 M	10 M

B.2.3 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

B.2.3.1 Kultivierung von *E. coli*, *L. monocytogenes* und *Yersinia sp.*

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte aerob:

- in Flüssigmedium in einem Schüttelinkubator (180-200 rpm) für 14-18h
- auf Agarplatten in einem Brutschrank für 18-48h

Die Flüssigmedien bzw. agarhaltigen Medien wurden je nach Bedarf mit den entsprechenden Zusätzen versehen (Tabelle 9).

E. coli Inkubation bei 37 °C in LB-Medium

L. monocytogenes Inkubation bei 37 °C in LB Medium

Y. enterocolitica Inkubation bei 27 °C in BHI-Medium

B.2.3.2 Anlegen einer Stammsammlung

Zur Langzeitlagerung wurden Stammkulturen aus flüssigen Übernachtskulturen angelegt. Dazu wurden die jeweiligen Kulturen bei 4000rpm pelletiert und in Einfriermedium (LB bzw. BHI +15% Glycerin) resuspendiert und bei -80°C gelagert.

B.2.3.3 Anlegen einer Bakterienkultur für *in vivo* Infektionen

Für *in vivo* Infektionsversuche werden die jeweiligen Stämme in BHI für 12-16h angezchtet, bei 3000rpm für 15min abzentrifugiert und das Pellet 3mal mit sterilen PBS gewaschen. Die Bakterien wurden in 1/10 des ursprünglichen Volumens der Übernachtskultur in Einfriermedium resuspendiert, in 1ml-Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

B.2.3.4 Lebendkeimzahlbestimmung für *in vivo* Infektionsversuche

Die Lebendkeimzahlbestimmung der eingefrorenen Aliquots erfolgte eine Woche nach dem Wegfrieren und wurde durch Ausplattieren mehrerer Verdünnungsreihen der Bakteriensuspension auf LB-Agar Platten ermittelt und als koloniebildende Einheiten (colony forming units = CFU) erfasst.

B.2.3.5 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen für *in vitro* Infektionsversuche

Die Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur erfolgte durch Messung der Absorption mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600nm (OD_{600}). Als Leerwert diente das jeweilige Medium. Ein Milliliter einer Bakteriensuspension in der exponentiellen Phase mit der $OD_{600} = 0,5$ enthält ca. 2×10^8 Bakterien.

B.3 Molekularbiologische Methoden

B.3.1 Isolierung und photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

B.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Gewinnung kleinerer Mengen an DNA (bis zu 20 μ g) erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden). Für größere DNA-Mengen (bis zu 100 μ g) wurde das Aufreinigungssystem Nucleobond AX 100 (Macherey & Nagel, Düren) verwendet.

Nach Anzucht der Kulturen über Nacht wurden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgeschlossen, die Proteine denaturiert und abzentrifugiert. Die sich im Überstand befindlichen Plasmide wurden anschließend durch Anionenaustauscherchromatographie gebunden, gewaschen und in $H_2O_{bidest.}$

eluiert. Die Plasmidisolierung erfolgte nach Herstellerbeschreibung. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

B.3.1.2 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung bakterieller genomischer DNA wurden 50 ml einer Übernachtskultur verwendet. Die Zellen wurden 15 min bei 8000 rpm pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und in 10 ml TES-Puffer resuspendiert.

TES-Puffer	40 mM Tris-HCl
(pH 8,0)	2 mM EDTA
	0,2 % SDS

Anschließend werden 50 μl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben, kurz gemischt und für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nun wurden 10 ml einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) hinzugegeben und vorsichtig durch mehrmaliges Invertieren gemischt, um ein Scheren der DNA zu vermeiden. Das Reaktionsgefäß wurde auf Eis gestellt bis die Phasentrennung einsetzte und dann bei 6000rpm für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung gemischt. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Die DNA in der wässrigen Phase wurde nun gefällt.

B.3.1.3 Fällung von DNA

DNA wird gefällt um sie aufzureinigen und/oder sie aufzukonzentrieren. Nach der Zugabe der 3-fachen Volumenmenge an EtOH (in Bezug auf die DNA-Lösung) und dem Zehntel an Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung wurde die Lösung für mindestens 30 min bei -80°C inkubiert, wobei die DNA ausfällt. Die DNA wurde bei 14.000g und 4°C für 15 min abzentrifugiert und mit eiskalten 70 % (v/v) unvergälltem Ethanol gewaschen. Der Alkohol wurde komplett entfernt und die DNA nach Trocknung im gewünschten Volumen gelöst.

B.3.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der Reinheit ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) und der Konzentration ($A_{260\text{nm}}$) der DNA erfolgte durch Messung der Absorption in einer Quarzküvette ($d=1\text{ cm}$) mit Hilfe eines Photometers. Als Leerwert diente $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$. Eine $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1,0 entspricht in etwa einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ gilt als Maß für die Reinheit und sollte $\geq 1,8$ betragen.

B.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifikation ausgewählter DNA-Fragmente *in vitro*. Als DNA-Polymerasen wurden verschiedene *Taq*-Polymerasen verwendet: AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City) und BioTaq red (Bioline, Luckenwalde), ohne 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, oder die über eine „proof reading“-Aktivität verfügende PfuUltra® II Fusion HS DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla). Die „proof reading“-Aktivität ermöglicht eine Korrektur fehlerhaft eingebauter Nukleotide und sorgt so für eine weniger fehlerbehaftete Amplifikation.

Der Bindebereich der zur Amplifikation eingesetzten Starteroligonukleotide (Primer) an das Template (=DNA-Matrize) betrug mindestens 20bp. Gegebenenfalls wurden zusätzliche Basen am 5'-Ende des Primers als Überhänge angefügt, wie z.B. für Restriktionsschnittstellen oder Homologiearme.

Die Schmelztemperaturen (T_m) der Primer wurden stets so gewählt, daß die Schmelztemperaturen der Bindestellen zwischen 55°C und 65°C lagen. Bei Primerpaaren betrug der T_m -Unterschied maximal 3°C. Die Berechnung der T_m erfolgte mit einem Internetprogramm namens Oligocalc.

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

Die Amplifikation wird durch eine mehrmalige Wiederholung von Temperatur-Zeit-Zyklen ermöglicht, die aus drei Schritten bestehen:

1. Denaturierung: die doppelsträngige Matrizen-DNA wird durch Erhitzen in zwei Einzelstränge getrennt
2. Annealing: Hybridisierung der Primer an die komplementären Einzelstränge
3. Elongation: Verlängerung der Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase entlang der DNA-Matrize

Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und liegt 2-5°C unter der T_m . Die für die Elongation benötigte Zeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Bereiches und von der verwendeten Polymerase.

B.3.2.1 Colony-Screen

Um viele Klone ohne Übernachtskultur testen zu können wurden Bakterien von einer Agarplatte abgenommen, in 30 µl H₂O_{bidest.} resuspendiert und für 10 min bei 95°C aufgekocht. Die Zelltrümmer und denaturierten Proteine wurden dann bei 14.000 rpm für 5 min abzentrifugiert. 1µl des Überstandes wurde als Template eingesetzt.

Die PCR-Reaktion wurde wie unter B.3.2.2 beschrieben angesetzt.

B.3.2.2 Reaktionsbedingungen der PCR

Die aufgereinigte DNA wurde je nach Konzentration 1:10 -1:20 verdünnt.

Reaktionsansatz	Template-DNA	1 μ l
	Primer 1 (100 μ M)	1 μ l
	Primer 2 (100 μ M)	1 μ l
	10 x Polymerasepuffer	5 μ l
	dNTP`s (je 2 mM)	5 μ l
	Polymerase	0,5 μ l
	H ₂ O _{bidest.}	ad 50 μ l

Programm

1. Schritt	5 min	95°C	(Denaturierung)	 35 x
2. Schritt	30 sek	94°C	(Denaturierung)	
3. Schritt	30 sek	T _m -(2 bis 5°C)	(Annealing)	
4. Schritt	x min	72°C	(Elongation)	
5. Schritt	5-7 min	72°C	(finale Elongation)	
6. Schritt	∞	4°C	(Abkühlen und „Lagerung“ der DNA)	

35 x Wiederholung der Schritte 2-4

Nach vollendeter PCR wurde sie im Agarosegel (B.3.3) überprüft und mit Hilfe von NucleoSpin Extract II (Machery & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben gereinigt.

B.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im Rückgrat der DNA-Moleküle wandern diese durch Anlegen eines elektrischen Feldes durch das Trägermaterial, das Agarosegel, in Richtung Anode. Dabei wandern lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente abhängig vom eigenen Molekulargewicht unterschiedlich schnell. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller kann es durch die Poren des Agarosegels wandern. Für eine effektive Auftrennung der Fragmente wird die Agarosekonzentration des Gels abgestimmt auf das Molekulargewicht der aufzutrennenden DNA.

In dieser Arbeit wurden Agarosekonzentrationen von 1,0-1,5 % [w/v] in 1x TAE verwendet.

Zur Größenbestimmung von linearen DNA-Fragmenten wurde der 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet (s. Abbildung 5; Negativbild).

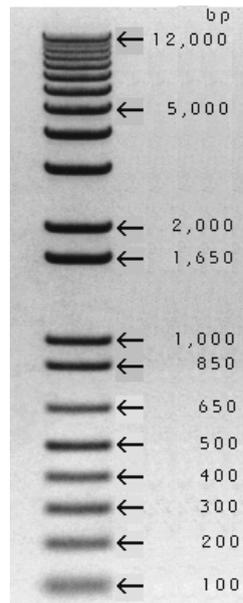


Abbildung 5: 1 kb plus DNA Ladder, DNA-Längenstandard

Auftrag: 0,7 µg Ladder pro Spur auf ein 0,9 %iges Agarosegel, gefärbt mit Ethidiumbromid, Negativbild

Elektrophoresepuffer (1 x TAE)

40 mM Tris-HCl pH 8,2

20 mM Eisessig

2 mM EDTA

Auftragspuffer (10 x)

30 % (v/v) Glycerin

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

in 1 x TAE

B.3.3.1 Analytische Gelelektrophorese

1,0 -1,5 % (w/v) Agarose wurden in TAE-Puffer aufgekocht bis eine klare Lösung entstand und nach Abkühlung auf 50°C in einen Gelschlitten gegossen. Das erstarrte Gel wurde in die Gelkammer gesetzt und mit 1 x TAE-Puffer überschichtet.

Die aufzutrennenden DNA-Lösungen wurden mit dem Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wurden die Proben für analytische Gelläufe bei konstanten 90 V und für präparative Gelläufe bei konstanten 80 V für jeweils 45-60 min aufgetrennt und gefärbt (s. B.3.3.2).

Die DNA-Isolierung aus Agarosegelen erfolgte mittels Nucleospin Extract II (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben.

B.3.3.2 Färbung von Agarosegelen mit Ethidiumbromid

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10-20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 µg Ethidiumbromid pro 1 ml H₂O_{dest.}) gefärbt und anschließend, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen, kurz gewässert. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert in diesem Komplex orange bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm, wodurch die DNA-Banden auf einem Transiluminator sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Dokumentationsanlage abfotografiert wurden.

B.3.4 Sequenzierung von DNA

Genomische DNA, Plasmide und PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung wie beschrieben (B.3.1) je nach Bedarf sequenziert. Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

B.3.5 Enzymatische Modifikation von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische, palindromische Nukleotidsequenzen der doppelsträngigen DNA erkennen und dort schneiden. Die dadurch entstehenden DNA-Fragmente besitzen definierte, charakteristische Enden, die für ein anschließendes, gezieltes Zusammenfügen verschiedener DNA-Fragmente von Nöten sind. Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen dient der Linearisierung von Plasmiden, dem Isolieren subklonierter DNA-Fragmente, dem direkten Verdau von PCR-Produkten für Klonierungen und/oder der Kontrolle von Klonierungen.

Eine weitere Möglichkeit der Modifikation von DNA ist die Dephosphorylierung. Dabei werden nach einem Restriktionsverdau die terminalen Phosphatreste entfernt, um eine Religation von linearisierten Plasmiden zu verhindern. Die letzte hier angewandte Modifikation ist die Ligation. Die Ligase bildet unter ATP-Verbrauch eine Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-OH-Ende und einem 5'-Phosphat-Ende zweier DNA-Fragmente.

B.3.5.1 Restriktionsverdau von DNA durch Endonukleasen

Der Restriktionsverdau erfolgt in Reaktionsansätzen von 10-50 µl bei der vom Enzymhersteller empfohlenen Temperatur und in dem jeweils optimalen Puffer. Die Temperatur betrug meistens 37°C. Sollten zwei Enzyme unterschiedliche Puffer benötigen, wurde nach einem für diese Anwendung optimalen Puffer gesucht, wobei die Enzymaktivität max. auf 75 % sinken sollte. Falls dies nicht möglich war, wurden die Restriktionsansätze nacheinander angesetzt.

Zur Kontrolle wurde der Restriktionsverdau mittels Gelelektrophorese überprüft (B.3.3) und bei Bedarf die entsprechende Bande aus dem Gel extrahiert.

B.3.5.2 Dephosphorylierung von DNA

Als dephosphorylierendes Enzym wurden die Bacterial Alkaline Phosphatase (Invitrogen, Karlsruhe) und die FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben verwendet. Das Enzym wurde im Falle der FastAP™ inaktiviert, während die Bacterial Alkaline Phosphatase durch das Aufreinigen der DNA mittels NucleoSpin Extract II (Macherey & Nagel, Düren) entfernt wurde, bevor das dephosphorylierte Plasmid für die Ligation eingesetzt wurde (B.3.5.3).

B.3.5.3 Ligation

Die in einen Vektor zu ligierenden DNA-Fragmente (Inserts) wurden in fünf- bis zehnfachen Überschuss in Relation zum Vektor in den Reaktionsansatz gegeben. Das Gesamtvolumen betrug 10-15 µl und enthielt neben Insert und Vektor den Ligasepuffer (5x oder 10x) sowie 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl; Invitrogen, Karlsruhe). Die Ligation erfolgte in der Regel bei 16°C über Nacht oder bei besonderen Anforderungen bei 4°C über das Wochenende (z.B. Blunt-end-Ligationen).

Eine Besonderheit stellt das Klonieren in T/A-Vektoren wie pMBL-T/A und pGEM-T easy dar. Da *Taq*-Polymerasen die Eigenschaft haben, an die 3'-Enden ein Desoxyadenosin anzuhängen und die T/A-Vektoren an den beiden 3'-Enden mit je einem Thymidin-Rest versehen wurden, können PCR-Produkte direkt, also ohne vorherige Behandlung mittels Restriktionsenzymen, in einen solchen Vektor kloniert werden. In beiden Vektoren wird das Insert innerhalb des LacZ-Gens eingebaut, was ein blue-white-Screening zulässt.

B.3.6 Transformation von DNA

B.3.6.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

500 ml LB-Medium werden 1:50 mit einer Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C (*E. coli*) respektive 27°C (*Yersinia*) unter Schütteln in einem Erlmeyerkolben mit Schikane bis zu einer OD_{600nm} 0,5-0,7 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann für 15 min auf Eis gestellt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C mit vorgekühlten Geräten durchgeführt. Die benötigten Lösungen wurden

über Nacht im Kühlschrank vorgekühlt und nach dem Animpfen der 500 ml LB-Kultur auf Eis gestellt. Die Zellen wurden bei 4.200 rpm für 10 min pelletiert und zweimal mit 200 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Danach wurde das Pellet in wenigen ml 10 % (v/v) Glycerin/ $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen und in ein Falcontube überführt. Das Falcontube wurde mit 10 % Glycerin/ $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 50 ml aufgefüllt und die Bakterien pelletiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in ca. 1ml 10 % Glycerin/ $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert und in auf Trockeneis vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

B.3.6.2 Elektroporation

Um elektrokompente Zellen zu transformieren wurde ein entsprechendes Aliquot des Bakterienstammes von -80°C langsam auf Eis aufgetaut. Parallel dazu wurde die Elektroporationsküvette auf Eis vorgekühlt. Die entsprechende DNA-Menge wurde auf 50 μl der Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und in die gekühlte Küvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser von Bio-Rad oder dem BTX ECM399 bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 μF . Sofort nach dem Stromstoß wurde 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und die Bakterien für 45-60 min bei optimaler Temperatur (37°C für *E. coli*, 27°C für *Yersinia* sp.) inkubiert. Die Bakterien wurden auf vorgewärmte Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika, zur Selektion transformierter Klone, ausplattiert.

B.3.7 Herstellung von Deletionsmutanten durch homologe Rekombination (ET-Cloning)

Die Herstellung von Deletionsmutanten erfolgte mit der Methode „ET-Cloning“, welches auf dem Prinzip der homologen Rekombination beruht. Durch die homologe Rekombination wird ein PCR-Fragment mit dem entsprechendem Genabschnitt im Genom oder Plasmid ausgetauscht. Diese Methode, ursprünglich nach dem RecE/RecT Rekombinationssystem des λ -Prophagen benannt, ist eine effektive Methode zur Herstellung von Mutanten. Die hohe Rekombinationseffizienz von $\text{red}\alpha$ und $\text{red}\beta$, die neben dem Exonucleaseinhibitor $\text{red}\gamma$ auf dem Vektor pKD46 codiert sind, ermöglichen den Einsatz kurzer homologer Strukturen von 50bp. Alle drei Proteine unterliegen einem L-Arabinose induzierbaren Promoter P_{araB} . Die Replikation des Plasmides ist temperaturabhängig, was zu einem Verlust des Plasmides über 30°C zur Folge hat.

B.3.7.1 Herstellung elektrokompetenter Stämme für die Mutagenese

Die Stämme werden wie unter B.3.6.1 kompetent gemacht, mit 1 µl des Vektors pKD46 transformiert und auf Carbenicillin-haltige Agarplatten über Nacht bei 27°C inkubiert (auch *E. coli*). Bei *Yersinia* ist die Antibiotikakonzentration aufgrund einer leichten β-Lactamase-Aktivität drei Mal so hoch (300 µg/ml). Es wurden Klone gepickt und eine Übernachtkultur (27°C) angeimpft, die am nächsten Tag 1:50 verdünnt und mit 0,1-0,2 % L-Arabinose versetzt wurde, wodurch die Rekombinasen induziert werden. Die Zellen werden bis zu einer OD von 0,5 bei 27°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen wieder elektrokompetent gemacht, mit dem Unterschied, daß die Zellen stets mit 10 % Glycerin/H₂O_{bidest} gewaschen und am Ende in 250 µl 10 % Glycerin/H₂O_{bidest} aufgenommen werden.

B.3.7.2 Primerdesign

Die Primer für das PCR-Fragment bestehen aus zwei Bereichen:

1. Einem Homologiearm von 50 Basen, dessen Sequenz mit der des flankierenden Bereichs des zu deletierenden Gens identisch ist und
2. dem 3'-Bereich des Primers, der aus 20 Basen besteht und den Primer für die Antibiotika-Kassette darstellt.

Damit ergibt sich ein Primer mit einer Länge von 70 Basen. Diese Primer wurden grundsätzlich HPLC gereinigt.

B.3.7.2.1 Herstellung des PCR-Produktes für die Rekombination

Die Herstellung eines PCR-Fragmentes geschah im Wesentlichen wie unter B.3.2.2 beschrieben. Für die Berechnung der Annealing-Temperatur wurde der Homologiearm nicht miteinberechnet. Die PCR-Ansätze betragen 100 µl und das Template wurde so weit es geht verdünnt (bis zu 1:1000). Als Template wurde der pACYC184 (Cm^r) bzw. der pACYC177 (Kan^r) verwendet. Die PCR wurde anschließend mittels Kit aufgereinigt, in 50µl H₂O_{bidest} aufgenommen und mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (20U) für 2 h bei 37°C inkubiert, um das Template zu entfernen. Die DNA wurde gefällt (B.3.1.3), getrocknet und in 10 µl H₂O_{bidest} resuspendiert.

B.3.7.2.2 Elektroporation und Selektion der Deletionsmutanten

1µl des für die homologe Rekombination hergestellten PCR-Produktes wurde zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen, die restlichen 9 µl wurden für die Elektroporation der kompetenten Zellen

(B.3.7.1) verwendet. Die Inkubationsdauer nach der Transformation betrug 2 h. Anschließend wurden die Zellen bei optimaler Temperatur auf Antibiotika-haltigen Agarplatten im Brutschrank inkubiert. Die Kontrolle der Mutagenese erfolgte bei *Yersinia* im SDS-Gel (s. Abbildung 7), im Western Blot (s. Abbildung 9 und 9) und mittels PCR. Die Mutagenese in *E. coli* wurde durch Sequenzierung und Isolierung des veränderten LPS nachgewiesen (B.3.8).

B.3.8 LPS-Präparation mittels Proteinase K-Verdau

Die Deletion des *msbB*-Gens in *E. coli* führt bei der LPS-Synthese zu einem Fehlen des Myristinsäurerestes. Daraus resultiert eine erheblich reduzierte Fähigkeit Immunzellen zu stimulieren und eine erniedrigte Entzündungsreaktion (Somerville *et al.* 1996; und 1999). Zur Kontrolle der Deletion des Genes wurde, neben der Sequenzierung und der PCR, das LPS isoliert und die Veränderung durch den Vergleich mit dem Wildtyp sichtbar gemacht.

5 ml einer Übernachtskultur der *msbB*-defizienten *E. coli*-Mutante sowie des Wildtyps (BL21-CodonPlus (DE3)-RIL) wurden pelletiert und einmal in PBS gewaschen. Die Bakterien wurden in PBS aufgenommen und auf eine OD von 0,5 bis 0,6 gebracht. 1,5 ml dieser Suspension wurden bei 1000 g für 3 min abzentrifugiert, das Pellet in 59 µl SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 100°C erhitzt. 25 µg Proteinase K wurde zugegeben und für 1h bei 60°C inkubiert.

10 µl jeder Probe wurde mittels 14 %igem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und am Ende einer Silberfärbung unterzogen (s. Abbildung 20).

B.4 Proteinbiochemische Methoden

B.4.1 Expression und Reinigung von Proteinen mit His₆-Tag

Für die Expression von Proteinen wurde der Vektor pET21b (Novagen, Darmstadt) benutzt. Durch diesen Vektor wird an den C-Terminus des zu exprimierenden Proteins ein His₆-Tag angefügt. Ferner enthält der Vektor das T7-RNA-Polymerase Promotorsystem (Studier *et al.* 1986), wobei das Zielgen durch den T7-Φ 10-Promotor reguliert wird. Die T7-RNA-Polymerase im verwendeten *E. coli*-Stamm (BL21 ΔmsbB, Tabelle 5) ist chromosomal codiert und wird durch den IPTG-abhängigen P_{taq}-Promotor reguliert. Dadurch wird insgesamt eine stringenter Kontrolle aber auch ein hoher Level der Expression erreicht.

B.4.1.1 Überexpression von Proteinen mit His₆-Tag

Für die Expression wurde ein 5 l-Fermenter mit 2xLB-Medium mit einer Übernachtskultur 1:50 beimpft und den Antibiotika Carbenicillin und Kanamycin versetzt. Die Kultur wurde unter ständigem Rühren (200rpm) und ständiger Belüftung (10 l/min) bis zu einer OD von 0,6 angezogen. Anschließend wurde der Fermenter auf 27°C abgekühlt. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 0,7mM IPTG (Endkonzentration). Nach 3 h wurden die Zellen bei 4200 rpm für 15 min sedimentiert, mit PBS gewaschen und bei -20°C weggefroren. Je 1ml der nicht-induzierten und der induzierten Kultur wurden vorher abgenommen und separat weggefroren. Diese Aliquots dienten der Expressionskontrolle und wurden mittel SDS-PAGE überprüft.

B.4.1.2 IMAC-Aufreinigung von Proteinen mit His₆-Tag

Die Affinitätschromatographie beruht auf der Wechselwirkung zweier Reaktionspartner. Bei der IMAC („Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography“) enthält die Säulenmatrix als Liganden ein Metallion und wurde das erste Mal 1975 zur Proteinreinigung eingesetzt (Porath *et al.* 1975). Für His₆-Tags können Nickel-, Kupfer-, Zink- und Cobaltionen verwendet werden. Wird ein Proteingemisch über die Säulenmatrix geleitet, interagieren die Seitenreste der Histidine des Fusionsprotein mit den Metallionen und bleibt so an die Matrix gebunden. Die Elution erfolgt durch Imidazol, das kompetitiv das Histidin aus dem Komplex verdrängt.

Die eingefrorenen, induzierten Bakterienpellets wurden im frisch mit 5mM PMSF sowie 300 U Benzonase versetztem Puffer WASH resuspendiert und durch drei bis vier French Press-Zyklen (1.000 psi) aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde zwei Mal bei 10.000g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde steril filtriert (0,22 µm), auf eine Säule mit „HisPur Cobalt Resin“ (Pierce, Rockford, USA) aufgetragen und mit dem Puffer WASH gewaschen, um alle ungebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend wurde mit einem Imidazolgradient 10-300 mM Imidazol durch Verwendung des Puffers ELU eluiert. Der Gradient wurde bei 10 % gestoppt, bis die Basislinie stabil verlief. Anschließend wurde der Gradient angelegt, bis mit 100 % des Puffers ELU eluiert wurde. Um das Imidazol zu entfernen, wurde entweder ein weiterer Reinigungsschritt (z.B. Gelfiltration) oder ein Dialyseschlauch (cut off ~ 10 kDa) angewandt.

Puffer WASH	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	10 mM Imidazol
	pH 7,4

Puffer ELU	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	300 mM Imidazol
	pH 7,4

B.4.1.3 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration, auch Ausschlusschromatographie genannt, nutzt man die unterschiedliche Wandergeschwindigkeit von Proteinen in einer Gelmatrix aus, wodurch die Proteine nach ihrer Größe getrennt werden. Die Gelmatrix, eine netzartige Struktur aus quervernetzten Polymeren, besitzt Poren, in die kleinere Moleküle hinein diffundieren, während größere Moleküle nicht eindringen können. Dadurch laufen Proteine mit zunehmender Größe schneller durch die Säule und eluieren damit früher. Die Gelmatrix (Superdex 200 PC 3.2/30) wurde mit einem Phosphatpuffer equilibriert und anschließend die Proteinprobe aufgetragen. Die fraktionierten Eluate wurden mittels SDS-PAGE (B.4.3) analysiert. Die passenden Fraktionen wurden gepooled und die Proteinmenge nach Bradford (B.4.6) bestimmt.

Phosphat-Puffer	40 mM NaH ₂ PO ₄
	50 mM NaCl
	pH 7,4

B.4.2 Isolierung von sekretierten Yop Proteinen aus dem Kulturüberstand

Yersinia-Stämme sekretieren bei 37°C und unter Zugabe von EGTA (Calciummangel) sowie MgCl₂ ihre Yops in den Kulturüberstand (Heesemann *et al.* 1986). Zusätzlich wird noch Glukose zugegeben um die sekretierte Proteinmenge zu erhöhen. Zum Nachweis und Kontrolle der eingeführten Mutationen bzw. Deletionen ins pYV-Plasmid wurden die in den Kulturüberstand sekretierten *Yersinia*-Proteine isoliert, mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und im SDS-Gel aufgetrennt. Dabei ergibt sich ein typisches Bandenmuster.

Eine Übernachtkultur, bei 27°C und unter Zugabe von Antibiotika inkubiert, wird 1:40 in antibiotikahaltigem BHI-Medium verdünnt und für 2 h bei 37°C weiter inkubiert. Durch Zugabe von MgCl₂ (final 10 mM), EGTA (final 5 mM) und Glukose (final 0,2%) wird die Sekretion stimuliert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 3 h bei 37°C wurden 2 ml der Kultur für 15 min bei 7500 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteine wurden mit 200 µl 100 % TCA aus dem Überstand (1,8 ml) gefällt und für mindestens 1 h auf Eis gestellt. Danach wurden die ausgefällten Proteine für 20 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem Aceton aufgenommen, für 20 min auf Eis

inkubiert, anschließend für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch zwei weitere Male durchgeführt. Der letzte Waschschrift erfolgte mit 1 ml H₂O_{bidest.} Das Pellet wurde dann in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

B.4.3 Auftrennung von Proben mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient insbesondere der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach deren Molekulargewicht. Aber auch Nukleinsäuren und Lipopolysaccharide können aufgetrennt werden. Um die Auftrennung von Proteinen unabhängig von deren Eigenladung zu machen, werden die Proteine bei 95°C denaturiert, mit β-Mercaptoethanol und mit dem anionischen Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) versehen. Durch das Erhitzen und das β-Mercaptoethanol, welches die vorhandenen Disulfidbrücken zwischen Cysteinen reduziert, werden die Proteine denaturiert. Durch das SDS werden nicht-kovalente Bindungen aufgelöst und die ursprüngliche Ladungsverteilung eines Proteins durch die Negativladung des SDS ersetzt. Damit ist das Verhältnis von Ladung und Größe für jedes Protein annähernd gleich. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die nun negativ geladenen Proteine durch das Trenngel und werden anschließend angefärbt. Mit Hilfe eines Proteinstandards kann die Molekulargröße von Proteinen bestimmt werden.

Standardmäßig wurden 11 %ige Polyacrylamid-Trenngele und 4 %ige Sammelgele mit Hilfe der Mini Protean Gelelektrophorese Kammern von Bio-Rad (München) hergestellt. Die Glasplatten wurden sorgfältig mit 70 % EtOH gereinigt und in den Gießstand eingespannt. Zuerst wurde das Trenngel bis ca. 1,5-2 cm unter den Gießrand gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde der Kamm entfernt und das Gel benutzt oder bei 4°C gelagert. Tabelle 10 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Proteingele

Tabelle 10: Zusammensetzung von Proteingelen

Trenngel		Sammelgel	
	11 %	14 %	4 %
750 mM Tris pH 8,8	5.000 µl		250 mM Tris pH 6,8
30 % Protogel	3.700 µl	4.800 µl	1250 µl
10 % SDS	200 µl		350 µl
H ₂ O _{dest.}	1.100 µl	-	50 µl
10 % TEMED	20 µl		850 µl
10 % APS	40 µl		15 µl
			15 µl

Durch das 2-Gel-System erhält man schärfere Banden, welche die Identifizierung von Proteinen unter Umständen vereinfacht. Der pH-Wert im Sammelgel liegt nahe dem isoelektrischen Punkt des Glyzins, welches als fast neutrales Zwitterion vorliegt und deshalb eine sehr geringe Mobilität im Gel hat. Das negativ geladene Chloridion hingegen ist sehr schnell. Zwischen den beiden Lauffronten ergibt sich ein Feldstärkegradient, wodurch die Proteine zusammengestaucht werden. Gelangt das Glyzin ins Trenngel, wird es negativ geladen und wandert aufgrund seiner geringen Größe sehr schnell durch Gel. Der Feldstärkegradient fällt zusammen und die Proteine werden nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt.

Die Proben wurden mindestens 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren. Das Bromphenolblau im Puffer ist für die optische Überwachung nötig und das Glycerin, damit die Proben in die Geltaschen absinken.

Als Größenstandard wurde der Benchmark Prestained Protein Ladder (Tabelle 11 Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 130-180 V für ca. 1 h.

Tabelle 11: Proteinstandard - Benchmark Prestained Protein Ladder

	Nummer der Bande	Molekulargewicht (kDa)
1	1	181,8
2	2	115,5
3	3	82,2
4	4	64,2 (rosa Bande)
5	5	48,8
6	6	37,1
7	7	25,9
8	8	19,4
9	9	14,8
10	10	6,0

Laufpuffer (1 x)

3,03 g Tris
14,4 g Glyzin
0,1 % SDS
ad 1 l H₂O_{dest.}

Auftragspuffer

125 mM Tris pH 6,8
20 % Glycerin
5 % SDS
5 % β-Mercaptoethanol
0,01 % Bromphenolblau

5 x 10 min	H ₂ O _{bide} st
10-20 min	0,1 % AgNO ₃ 0,02 % Formaldehyd
bis sich eine dunkle Färbung zeigt	2,5 % Na ₂ SO ₃ 0,01 % Formaldehyd pH 11,3 – 11,8
≥ 5 min (Stoppen der Reaktion)	0,05 M EDTA

B.4.5 Western Blot Analyse

Anstatt Proteine anzufärben, können diese auch mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Dazu werden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines konstanten, angelegten Stromflusses im Tank-Blot-Verfahren auf eine Membran (z.B. Nitrocellulose) transferiert. Damit die später zugegebenen Antikörper nicht unspezifisch an der Membran haften, wurde die Nitrocellulosemembran durch Inkubation in einer Milchpulver-Lösung für mindestens 1 h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) geblockt. Danach wurde die geblockte Membran dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit einem gegen das zu detektierende Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurde mit einem zweiten, alkalische Phosphatase gekoppeltem, Antikörper inkubiert, der spezifisch den ersten Antikörper erkennt. Anschließend wurden durch Waschen nicht gebundene Antikörper entfernt. Das Enzym alkalische Phosphatase des Zweitantikörpers setzt das zugegebene, farblose BCIP/NBT-Substrat in einen blau-violetten Niederschlag um, welcher sich an der Membran anlagert und so die detektierten Proteinbanden sichtbar macht.

Blot-Bedingungen 350 mA
 60 min

Blockpuffer 5 % Milchpulver
 0,5 % Tween 20
 In 1 x PBS

Waschpuffer 0,5 % Tween 20 in 1 x PBS

BCIP/NBT-Substrat BCIP/NBT-Blue Liquid Substrate System (Sigma, Taufkirchen)

Einfriermedium	10 % DMSO in FCS
----------------	------------------

Peptide

Die Peptide wurden von der GenScript Corporation (Piscataway, NJ 08854, USA) synthetisiert.

LLO₉₁₋₉₉ (GYKDGNEYI)

LLO₁₉₀₋₂₀₁ (NEKYAQAYPNVS)

B.5.2 Eukaryotische Zellen

Tabelle 14 zeigt die verwendeten eukaryotische Zellen.

Tabelle 14: Verwendete eukaryotische Zellen

Zelllinie	Merkmale	Referenz/Bezugsquelle
P-388D1	murine Makrophagenzelllinie	DSMZ, Braunschweig
LLO-spezifische T-Zellen	gewonnen aus infizierten Mäusen, primäre Zellen	Prof. Geginat, Heidelberg und diese Arbeit
Dendritische Zellen	aus Knochenmarkszellen differenziert	diese Arbeit

B.5.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

B.5.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Zellen wurden in DMEM mit den entsprechenden Additiven im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in 250 ml-Flaschen kultiviert. Bevor Zellen mit neuem Medium in Kontakt kamen, wurde dieses auf 37°C vorgewärmt.

Zum Ablösen der adhärennten P388-Makrophagen wurden sie mit 2 ml einer Trypsin-Lösung versehen und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurden die Zellen in 5 ml DMEM aufgenommen, bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und in neuem Medium resuspendiert.

Die Stammhaltung eukaryotischer Zelllinien erfolgte in Einfriermedium (10 % DMSO in FCS). Die Zellen wurden nach dem Zentrifugieren in Einfriermedium aufgenommen und zunächst über Nacht bei -20°C gelagert, dann für mindestens 24h bis maximal ein Jahr auf -80°C gesetzt. Für eine Langzeitlagerung wurden die Zellen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

B.5.3.2 Neuanlage und Kultivierung von spezifischen T-Zellen

Spezifische T-Zellen konnten aus Milzen von Mäusen gewonnen werden, die mit *Listeria monocytogenes* infiziert wurden. Dazu wurde eine primäre *L. monocytogenes*-Infektionsdosis von 2×10^3 Bakterien i.v. gegeben. Die zweite Infektionsdosis erfolgte 14 Tage nach Erstinfektion mit einer Dosis von 1×10^6 Listerien, die i.v. gegeben wurde. 10 Tage nach der Zweitinfektion wurde die Milz entnommen, durch ein 70 μm -Zellsieb gerieben und bei 2000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml Puffer ERY resuspendiert und 2 min per Hand geschüttelt, um die Erythrozyten zu lysieren. Um die Reaktion zu stoppen wurden 4 ml Alpha MEM-Medium hinzugegeben und die Zellen pelletiert. Anschließend wurden die Zellen 3 Mal mit Medium gewaschen und in T-Zell-Medium ohne IL2 resuspendiert und gezählt.

Pro Vertiefung einer 24-well-Platte wurden 15×10^6 Zellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml sowie das entsprechende Peptid in einer Konzentration von 10^{-8} M gegeben.

Nach 5 Tagen wurde 1 ml Medium abgesaugt und durch 1 ml frisches T-Zell-Medium mit IL2 ersetzt. Nach 14 Tagen erfolgte eine Restimulation der T-Zellen mit 6×10^6 Mitomycin C behandelten Milzzellen, die als antigenpräsentierende Zellen (APC) fungierten.

Puffer ERY 0,15 M NH_4Cl , pH 7.4

T-Zell-Medium Alpha MEM Eagle
1 % T-Zell-Supplement
20 U/ml IL2

B.5.3.3 Behandlung von Milzzellen mit Mitomycin C

Mitomycin C interkaliert mit der DNA und hemmt deren Synthese. Durch die Behandlung von Milzzellen mit Mitomycin C wird somit deren Proliferation verhindert, wodurch die behandelten Zellen die T-Zellen nicht überwuchern und in Nahrungskonkurrenz treten können.

Die Milz einer uninfizierten Maus wurde entnommen, durch ein Zellsieb gerieben und in Alpha MEM Eagle-Medium aufgenommen. Die Zelldichte betrug 40×10^6 Zellen/ml. Auf 4 ml Zellsuspension wurden 250 μg Mitomycin C gegeben und für 20 min bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und 4 Mal mit Medium gewaschen. Die Zellen wurden in T-Zell-Medium resuspendiert und auf eine Zelldichte von 6×10^6 Zellen/ml eingestellt.

B.5.3.4 Differenzierung von Knochenmarkszellen

Die Gewinnung von dendritischen Zellen (DCs) aus dem Knochenmark geschah nach der Beschreibung von (Lutz *et al.* 1999). Die Knochenmarkszellen wurden in DMEM mit 200 U/ml rmGM-CSF aufgenommen. Pro Petrischale wurden 2×10^6 Zellen in 10 ml GM-CSF-haltigen Mediums ausgesät (Tag 0) und am Tag 3 wurden weitere 10 ml des GM-CSF-Mediums hinzugeben. Am Tag 6 wurden 10 ml steril abgezogen und bei 1200 rpm für 8 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und zurück in die Petrischale gegeben. Am Tag 8 wurden die Zellen geerntet, mit MACS CD11c (N418) Microbeads inkubiert und nach Herstelleranweisung über eine LS Säule gereinigt (beides von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Die DCs fanden Verwendung für den Antigenpräsentationsassay (B.5.6).

B.5.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mittels Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahlbestimmung eukaryotischer Zellen erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer. Um vitale von nicht-vitalen Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt. Lebende Zellen nehmen kein Trypanblau auf, während bei Zellen mit permeabilisierter Zellmembran das Trypanblau bis ins Zytoplasma gelangt und dadurch die toten Zellen tiefblau färbt. Hierzu wurden 10 μ l der Zellsuspension mit 90 μ l der Trypanblaulösung (0,5 % (m/v) Trypanblau in 0,85 % (m/v) NaCl-Lösung) gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Anschließend wurden mindestens zwei der Großquadrate ausgezählt und daraus die Keimzahl berechnet.

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{durchschnittliche ermittelte Zellzahl pro Großquadrat} \times 10^4$$

B.5.5 Infektion von eukaryotischen Zellen mit *Y. enterocolitica*

Je eine Übernachtskultur der entsprechenden *Y. enterocolitica*-Stämme (27°C, BHI) wurde 1:100, in mit 1 mM CaCl₂ supplementiertem, BHI-Medium verdünnt und bei 37°C für 3 h inkubiert. Durch das CaCl₂ wird nicht die Bildung von Yops, wohl aber deren Sekretion verhindert. Anschließend wurden die Bakterien bei 6000 rpm für 10 min abzentrifugiert, in PBS gewaschen und in PBS aufgenommen. Mittels Photometer wurde die OD₆₀₀ gemessen und daraus die Bakterienanzahl ermittelt (B.2.3.5). Die Bakteriensuspensionen wurden entsprechend den für die Infektion gewünschten MOIs („multiplicity of infection“ = Verhältnis Bakterienzahl zur Anzahl eukaryotischer Zellen) verdünnt.

B.5.6 *in vitro* Antigenpräsentationsassay (APA)

Die für den *in vitro* Antigenpräsentationsassay (APA) notwendigen spezifischen T-Zellen wurden entweder selbst erzeugt (s. B.5.3.2) oder aus dem Labor von Prof. Geginat (Mannheim) bezogen.

Als antigenpräsentierende Zellen (APC) dienten P388-Zellen (Makrophagenzelllinie) oder die aus dem Knochenmark von Balb/c-Mäusen gewonnenen und differenzierten DCs (B.5.3.4).

3×10^4 antigenpräsentierende Zellen wurden in einer 96-well Flachboden Mikrotiterplatte in Alpha-MEM-Eagle-Medium ohne Antibiotikum ausgesät. Durch Zugabe der verschiedenen *Yersinia*-Stämme mit einer MOI von 1, 10, 50 oder 100 und der anschließenden Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm (200g) wurde die Infektion gestartet. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h, 2 h und 4 h) bei 37 °C im CO₂-Brutschrank wurden die APC zweimal mit 200 µl CN-Medium gewaschen und verbleibende Bakterien (z.B. an der Zelloberfläche) getötet. Dafür wurden 200 µl CN-Medium zugegeben und die Zellen damit für 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und durch 100 µl frischem CN-Medium ersetzt. 3×10^4 von viermal gewaschenen T-Zellen (um das IL2 zu entfernen) wurden in einem Volumen von 100 µl zu den infizierten APC pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 18 h im CO₂-Brutschrank bei 37°C. Der Überstand wurde steril abgenommen und die IFN γ -Konzentration mittels ELISA bestimmt (B.7.2).

CN-Medium	Alpha-MEM-Eagle ohne Pen/Strep 50 µg/ml Gentamicin
------------------	---

B.6 Infektionsversuche an Mäusen

B.6.1 Mausstämme

Für *in vivo* Infektionsversuche und Immunisierungsstudien wurden weibliche, 6-8 Wochen alte Mäuse verwendet, die von Harland/Winkelmann (Borchen) bezogen wurden. Die Mausstämme waren:

1. Balb/c Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2K^d
2. CB6F1 Diese Mäuse sind eine Kreuzung aus Balb/c ♀ mit C57BL/6 ♂ und tragen somit den MHC-Haplotyp H-2K^d und H-2K^b

Nach Ankunft wurden die Tiere vorerst für 7 Tage in Quarantäne gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen in belüfteten Käfigen. Steriles Zuchtfutter sowie steriles Trinkwasser wurde den Mäusen bereitgestellt.

B.6.2 Mauspassage

50 µl einer Übernachtskultur eines Bakterienstammes wurden je einer Balb/c Maus intraperitoneal (i.p.) injiziert. Ausnahme bildete der Stamm WA-C(pYV::CM) bzw. WA-314, da dieser zu virulent ist, und die Maus getötet hätte. 18-24 h nach Infektion wurden die Mäuse durch CO₂ und Genickbruch getötet und das Peritoneum mit 5 ml PBS gespült. 200 µl jeder Spülung wurden auf antibiotikahaltigen Blutagarplatten ausplattiert. Gepickte Kolonien der Deletionsmutanten wurden nochmal auf die sekretierten Yop-Effektorproteine hin untersucht (s. B.4.2) und bei -80°C eingefroren.

B.6.3 Infektions- und Immunisierungsexperimente

B.6.3.1 Applikationsformen

B.6.3.1.1 Orale Infektion

Die für die orale Infektion verwendeten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und entsprechend der Keimzahl verdünnt und mit eiskaltem PBS gewaschen. Pro Maus wurden 1×10^9 Bakterien in einem Volumen von 10-15 µl oral mit der Pipettenspitze appliziert. Dabei ist zu beachten, daß die Maus nicht verletzt wird.

Die Mäuse wurden am Vorabend des Experimentes nüchtern gestellt.

B.6.3.1.2 Intraperitoneale (i.p.) Infektion / Immunisierung

Bei i.p. Infektionen wurden 50 µl einer Bakteriensuspension durch das Peritoneum der Maus mittels einer 1 ml-Spritze gespritzt. Eine Ausnahme war der *Yersinia*-Stamm WA-C(pYV::CM) bzw. WA-314. Immunisierungen mit *L. monocytogenes* wurden mit einer Dosis von 5×10^3 in 100µl i.p. durchgeführt. Bei i.p. Immunisierungen mit Proteinen wurden Volumina von 150 µl gespritzt.

B.6.3.1.3 subkutane (s.c.) Immunisierung

Das zu spritzende Volumen betrug wie bei der i.p. Immunisierung 150 µl. Dazu wurden die Mäuse am Rücken im abdominalen Bereich mit Hilfe eines Barthaarschneiders rasiert. Unter einem Abzug

wurden die Mäuse mit Diethylether betäubt. Während der Betäubung wurde die rasierte Haut der Tiere gestrafft und die Spritze flach unter die Haut eingeführt.

B.6.3.1.4 intravenöse (i.v) Infektion und Applikation von Antibiotika

Die zu infizierenden Mäuse wurden für 10-15 min unter einer Rotlichtlampe gehalten, sodaß sich die Blutgefäße erweiterten. Mit Hilfe einer Spritze und einer möglichst dünnen Kanüle wurden 100 µl einer Bakteriensuspension oder einer Antibiotikallösung in die laterale Schwanzvene appliziert. Als Antibiotikallösung diente Ciprofloxacin, welches in einer Konzentration von 15 mg/ml in leicht alkalischen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst war (pH=7,5). Das Gewicht einer Maus lag durchschnittlich bei 20 g. Somit ergab sich als Dosis 75 mg/kg Körpergewicht. Die LD_{50} beträgt i.v. 122 mg/kg Körpergewicht.

B.6.3.2 Kolonisierung / zelluläre Immunantwort

Für die Untersuchungen der Deletionsmutanten auf das Fehlen der deletierten Yop Effektorproteine und deren Auswirkungen in Bezug auf die Fähigkeit Organe zu kolonisieren, wurden Balb/c-Mäuse in Gruppen á fünf Tieren i.v. und oral infiziert (s.o.). Die Bakterien stammen aus Aliquots mit Keimzahlbestimmung (s. B.2.3.4) und wurden vor der Infektion zwei Mal mit PBS gewaschen und auf die gewünschte Keimzahl, durch Verdünnung mit PBS, eingestellt.

Bei i.v. Infektionen wurde es u.U. notwendig, die Mäuse mit Antibiotika zu behandeln. Dazu wurde den Mäusen am 3. Tag nach der Infektion das Antibiotikum Ciprofloxacin in der Früh i.v. gespritzt. Am selben Tag folgten drei weitere Gaben. Diese wurden in einem Zeitintervall von 3 h i.p. gegeben. Die Antibiotika-Therapie dauerte insgesamt 7 Tage, wobei ab dem 4. Tag die erste Dosis anstatt i.v. i.p. gegeben wurde.

Nach 3, 5 oder 7 Tagen wurden die Mäuse durch CO_2 und Genickbruch getötet. Unter aseptischen Bedingungen wurden folgende Organe entnommen und homogenisiert. Milz und Peyer'sche Plaques wurden in einer Schwingmühle in einem Volumen von 1 ml PBS homogenisiert. Die Leber wurde in 5 ml PBS in Glasmörser vorsichtig zerrieben. Der entnommene Dünndarm wurde mit 5 ml PBS gespült und der Darminhalt in ein steriles Falcontube überführt. Die Homogenisate wurden in Verdünnungsschritten von 1:10 in PBS verdünnt und auf CIN-Agar ausplattiert. Die Platten wurden für 48 h bei 27°C inkubiert und die Kolonien gezählt (= CFU-Bestimmung). Anschließend wurde die Gesamtkeimzahl pro Organ bzw. Dünndarminhalt berechnet.

B.6.3.3 Immunisierungsexperimente

Die Immunisierungsexperimente mit Mäusen wurden mit Fusionsproteinen gemacht. Diese rekombinanten, aufgereinigten und entsalzten Proteine wurden im selben molaren Verhältnis eingesetzt und je auf ein Volumen von 100 µl mit PBS eingestellt. Der jeweiligen Proteinlösung wurden 50 µl IFA zugegeben, so daß ein Gesamtvolumen von 150 µl entstand. Dieses Volumen wurde Balb/c bzw. CB6F1-Mäusen, in Gruppen zu je zehn Tieren, injiziert.

B.6.3.4 Schutzversuch / Challenge

Um zu überprüfen, ob ein ausreichender Schutz durch die Infektion oder Immunisierung der Mäuse erreicht wurde, wurden die Mäuse 4-6 Wochen nach Beginn des Experimentes mit *L. monocytogenes* infiziert. Die Dosis betrug 1×10^4 Bakterien und wurde i.v. appliziert. Als Kontrollgruppe dienten uninfizierte bzw. nicht immunisierte Mäuse. Nach 3 Tagen wurde die Gesamtkeimzahl in der Milz durch verschiedene Verdünnungen der Homogenisate auf PALCAM-Listeria-selective Agar bestimmt. Die Platten wurden für 48 h bei 37°C inkubiert und dann die Kolonien gezählt.

B.7 Immunologische Methoden

B.7.1 Entfernung von Endotoxin und dessen Konzentrationsbestimmung

Bei der Aufreinigung rekombinanter Proteine werden bei der Lyse der Bakterien Lipopolysaccharide (LPS, Endotoxin) freigesetzt, welche die Proteinlösung verunreinigen und vor Vakzinierungen entfernt werden müssen. LPS ist ein Hauptbestandteil der bakteriellen Zellmembran und wird vom angeborenen Immunsystem erkannt. Höhere Dosen LPS können bei Menschen zu toxischen Schockreaktionen führen.

Die Entfernung von Endotoxin wurde mittels dem EndoTrap[®] red-Kit (Profos, Regensburg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des Limulus-Tests (kinetisch-turbidimetrischen Methode) bei der Firma ACILA AG (Weiterstadt) bzw. Profos (Regensburg).

B.7.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Der ELISA ist ein immunologisches Verfahren, mit dem Proteine oder niedermolekulare Verbindungen durch spezifische Antikörper, basierend auf einer enzymatischen Reaktion, nachgewiesen werden können. Dazu werden Antikörper, die an die nachzuweisenden Moleküle (Antigen) spezifisch binden, in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Antikörper binden an die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatte. Freie Bindungsstellen werden mit BSA gesättigt. Ein zweiter, biotinylierter Antikörper wird hinzugegeben, der an den bestehenden Antikörper-Antigen-Komplex bindet. Ein Streptavidin-HRP-Konjugat bindet wiederum an das Biotin und durch Zugabe einer Substratlösung verfärbt sich die Lösung in Abhängigkeit der Konzentration des Antigens. Die Auswertung erfolgt photometrisch und mit Hilfe einer Standardkurve.

Das verwendete System (Kit) war das „DuoSet mouse IFN γ “ von R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt. Detektion und Pufferherstellung erfolgte wie vom Hersteller angegeben.

B.7.3 ELISpot-Assay (enzyme-linked immunospot assay)

Der ELISpot-Assay, eine Modifikation eines ELISA-Assays, dient zum Nachweis spezifischer IFN γ -produzierender T-Lymphozyten nach Infektion oder Immunisierung einer Maus. Die Splenozyten immunisierter Mäuse wurden mit einem spezifischen Peptid inkubiert und so die Bildung von IFN γ stimuliert, welches von Antikörpern in einer Farbreaktion detektiert und als Spots (Punkte) sichtbar gemacht wurde. Somit wird im Gegensatz zum ELISA nicht eine Gesamtkonzentration gemessen, sondern die Anzahl spezifischer, IFN γ -produzierender T-Lymphozyten.

Hierfür wurde eine spezielle 96-well Platte (ELISpot-Platte), deren Boden aus einer Nitrocellulosemembran besteht (silent screen plates, Nunc, Wiesbaden), mit einem monoklonalem anti-IFN γ -Antikörper beschichtet (Endkonzentration 10 $\mu\text{g/ml}$) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Entnahme der Milz immunisierter Mäuse, wurden die Splenozyten durch ein Zellsieb geschickt und bei 1500 rpm und 20°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, die restlichen Zellen resuspendiert und mit 4ml ACT-Puffer versetzt. Durch das darin enthaltene NH $_4$ Cl werden die Erythrozyten lysiert. 5 min nach Zugabe von ACT wurden 5 ml DMEM (mit FCS) hinzugegeben und die Zellen bei 1600 rpm und 20°C für 8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Alpha MEM Eagle mit allen Zusätzen (s. Tabelle 13, ferner ELISpot-Medium genannt) resuspendiert, die Zellzahl bestimmt (s. B.5.4) und auf 5×10^5 Zellen pro 100 μl eingestellt. Je 100 μl (= 5×10^5 Zellen) wurden in einer Rundboden-Mikrotiterplatte in Gegenwart von 10^{-6}M synthetischem Peptid (CD4 bzw. CD8-Epitop) für 4 h bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO $_2$ inkubiert. Diese aktivierten T-Zellen wurden auf die ELISpot-Platte transferiert und für weitere 18 h im Brutschrank inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die T-Zellen mit Concanavalin A stimuliert. Als Negativkontrolle diente Medium. Die Detektion spezifischer T-Zellen erfolgte mittels biotinylierten anti-Maus IFN γ -Antikörper und einem

Avidin-Peroxidase-Konjugat. Durch Zugabe von AEC startete die 30 minütige Farbreaktion, die durch Zugabe von Leitungswasser gestoppt wurde. Die Membran wurde getrocknet und die einzelnen Punkte eines jeden wells gezählt. Die Anzahl der gezählten Spots entspricht der Menge spezifischer IFN γ -sezernierender T-Zellen.

B.7.4 Durchflußzytometrie / FACS

Parallel zum ELISpot-Assay wurden die Milzzellen mittels FACS untersucht, jedoch gelang hier nur die Untersuchung von CD8-positiven Zellen. Dazu wurde eine Tetramer-Färbung durchgeführt. Das Tetramer wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von D.H. Busch (TU München) hergestellt und zur Verfügung gestellt.

B.7.4.1 Tetramerfärbung

Mit dieser Methode werden antigenspezifische T-Zellen direkt markiert, sodaß sie mit der Durchflußzytometrie detektiert werden können. T-Zellen erkennen Antigene/Peptide, die auf MHC-Molekülen präsentiert sind. Ein Tetramer besteht aus vier solcher MHC-Peptid-Komplexe, wodurch die Avidität der Wechselwirkung zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Peptid-Komplex erhöht wird. Diese Tetramere sind zudem fluoreszenzmarkiert, wodurch eine Visualisierung mittels Durchflußzytometrie ermöglicht wird.

Die Milzzellen werden wie beim ELISpot-Assay bis einschließlich der Zellzahlbestimmung behandelt. Eine Stimulation erfolgt nicht. Die Zellen werden bei 4°C für 8 min bei 1500 rpm zentrifugiert und in einem Zehntel des Volumens aufgenommen. Die Zellzahl beträgt nun 5×10^6 Zellen pro 100 μ l. Für die Tetramerfärbung, die in einer 96-well Rundbodenplatte stattfand, wurden 5×10^6 Zellen pro Färbeansatz verwendet. Die Zellen wurden für 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die toten Zellen zu färben, wurden pro well 100 μ l EMA-Puffer hinzugegeben und die Zellen für 20 min unter einer Lampe inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ l FACS-Puffer und das Resuspendieren der Zellen. Die Zellen wurden für 2 min bei 4 °C und 1500 rpm zentrifugiert und mit 200 μ l FACS-Puffer gewaschen. In jedes Well werden nun 50 μ l der Antikörper-Mischung pipettiert und die Zellen für 45 min im Dunklen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1x100 μ l und 2x mit 200 μ l FACS-Puffer gewaschen. Die Fixierung der gefärbten Zellen erfolgte mit 300 μ l 1 % PFA in FACS-Puffer.

EMA-Puffer:

100 μ l FACS-Puffer

0,1 μ l EMA

1 µl Fc Block (1:100)

FACS-Puffer (in 1l PBS):

0,5% (M/V) BSA

0,02% (V/V) NaN₃

pH 8,0

Antikörper-Mischung:

50 µl FACS-Puffer

1 µl LLO-Tetramer PE

0,5 µl CD8 APC-AF750

0,5 µl CD127 APC

1 µl CD62L FITC

B.7.4.2 Durchflußzytometrie-Messung (FACS-Analyse)

Mit einem FACS-Gerät (fluorescence activated cell sorter, FACS) kann die relative Größe, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Dazu werden Zellen durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet. Dabei wird beim Passieren von jeder einzelnen Zelle das Licht gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*) ist das Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*) das Maß für die Granularität einer Zelle. Die Fluorochrome (z.B. FITC, PE) absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer anderen Wellenlänge. Das emittierte Licht wird gemessen, wodurch die Anzahl der fluoreszierenden Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität ermittelt werden.

Die Messungen erfolgten mit einem FACSCanto-Durchflußzytometer, die Auswertung mithilfe der FlowJo-8.4.6 Software (Tree Star; San Carlos, USA).

B.8 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben und auf Normalverteilung untersucht. Statistische Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA bei Normalverteilung der Werte oder mit einem Kruskal-Wallis-Test bei nicht-normalverteilten Werten ausgewertet. Bei Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde anschließend ein Tukey-Test bzw. Dunns-Test durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 ($p < 0,05$) wurden als statistisch signifikant angenommen.

C ERGEBNISSE

C.1 *Yersinia*-Deletionsmutanten als Impfstoffträger

Pathogene *Yersinien* enthalten ein ca. 70kb großes pYV-Plasmid, auf welchem ein Typ-III-Sekretionssystem sowie die Yop Effektorproteine (Virulenzfaktoren) kodiert sind. Das Typ-III-Sekretionssystem ermöglicht die Translokation der Effektorproteine in das Zytoplasma der eukaryotischen Zelle (Cornelis 2002).

Durch die systematische Deletion von einem oder mehreren *yop*-Genen sollte der Einfluß von Yops auf die Virulenz und immunogenen Eigenschaften untersucht werden. Ziel dabei war es, Mutanten mit einer ausgewogenen Balance zwischen Attenuierung und Virulenz zu generieren, sodaß eine systemische Infektion in Mäusen nicht zum Tode bzw. schweren Krankheitsverläufen führt, aber gleichzeitig eine gute Immunantwort und somit einen Schutz hervorruft.

C.1.1 Herstellung von *Yersinia*-Doppelmutanten

Mittels ET-Klonierung (s. B.3.7), ein ursprünglich für *E. coli* entwickeltes Verfahren, wurden *Yop*-Deletionsmutanten hergestellt. Das Prinzip dieser Klonierungsmethode, dargestellt in Abbildung 6, basiert auf der homologen Rekombination mit Hilfe der Rekombinasen Red α und Red γ . Dabei wurden *yop*-Gene durch Antibiotika-Resistenz-Kassetten ersetzt.

Für die Herstellung der Δ PLcrV_{K42Q}-Mutante wurde ein Stamm mit einer bestehenden K42Q-Punktmutation im *lcrV*-Gen verwendet: WA-C(pYVLcrV_{K42Q}). In dieser Mutante wurde mittels ET-Klonierung das Gen *yopP* durch eine Antibiotika-Resistenz-Kassette ersetzt. Die Vorgehensweise ist ansonsten identisch mit der zur Erstellung von *Yop*-Doppeldeletionsmutanten.

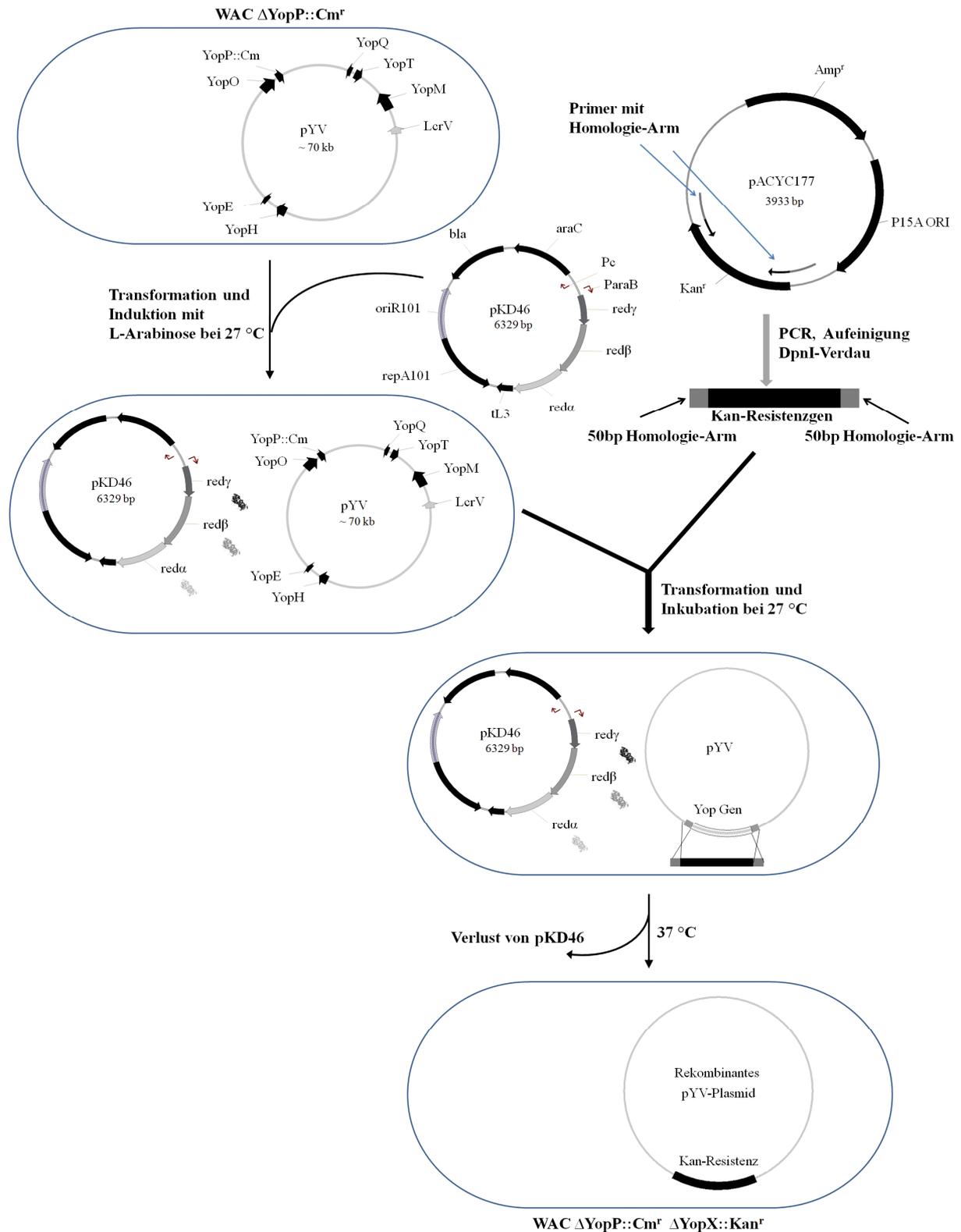


Abbildung 6: Prinzip der ET-Klonierung in *Y. enterocolitica*.

Nach Transformation der *Yersinia* YopP-Mutante (Cm^r) mit dem Plasmid pKD46, wurde die Expression der Rekombinasen und eines Exonucleaseninhibitors bei 27 °C durch Zugabe von 0,2 % L-Arabinose induziert. Das PCR-Fragment bestand aus einer Kan^r-Kassette, die von 2 Homologiearmen flankiert wurde. Durch homologe Rekombination der Homologiearme mit den entsprechenden Sequenzen auf dem pYV-Plasmid, wurde das entsprechende yop-Gen durch eine Kan^r-Kassette ersetzt. Durch den Temperaturwechsel auf 37 °C kam es zum Verlust des pKD46-Plasmides.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde, ausgehend von einer YopP-Deletionsmutante (Cm^r), je ein weiteres *yop*-Gen mit einer Kanamycin-Resistenz-Kassette (Kan^r) ersetzt.

Dazu wurde ein PCR-Fragment hergestellt, welches aus der Kan^r-Kassette sowie zwei flankierenden Armen besteht, die homolog dem up- und downstream Bereich der zu deletierenden Sequenz sind. Dabei wurde die Kan^r-Kassette mit dem eigenen Promotor und Stopcodon amplifiziert.

Die Primer für das PCR-Fragment bestehen aus zwei Bereichen. Der erste Bereich dient zur Amplifikation der Kan^r-Kassette von pACYC184 (accession number X06403) und besteht aus 21bp. Der zweite Bereich ist der Homologiearm mit einer Länge von 50bp, dessen Sequenz mit einem kurzen Bereich außerhalb des zu ersetzenden Genes identisch ist. Als Referenz wurde das pYV-Plasmid pYVa127/90 mit der accession number NC_004564 verwendet.

Elektrokompetente Yersinien des Stammes Δ YopP-Cm^r (s. Tabelle 4) wurden mit dem Vektor pKD46 transformiert. Die Induktion der Expression der Gene *reda*, *red β* , *red γ* erfolgte durch Zugabe von 0,1% Arabinose in LB-Medium über einen Zeitraum von 4 Stunden. Die so gewonnenen Zellen wurden mit dem PCR-Fragment transformiert und auf Antibiotika-haltigen Platten selektioniert. Das veränderte pYV-Plasmid wurde anschließend extrahiert und in den plasmidlosen *Yersinia*-Stamm WA-C transformiert, um eventuelle, unerwünschte Rekombinationen mit dem Bakteriengenom auszuschließen.

Die Mutationen wurden zum einen mittels PCR nachgewiesen und zum anderen durch die Erfassung der Yop-Sekretion. Die sekretierten Yop-Proteine wurden isoliert und im SDS-Gel sowie Western-Blot analysiert (s.B.4.3 und B.4.5).

Die *yop* Deletionsmutanten wurden bei 37°C in BHI-Medium unter Ca²⁺-Mangel inkubiert, abzentrifugiert und die Proteine aus dem Kulturüberstand gefällt (s.B.4.2). Die gefällten Proteine wurden mit Aceton und H₂O gewaschen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. Abbildung 7 zeigt das typische Bandenmuster der sekretierten und aus dem Kulturüberstand gefällten Yops des Wildtypstammes WA-314 sowie der *yop* Deletionsmutanten im SDS-Gel. Die Positionen der deletierten Yops sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Nicht erkennbar im SDS-Gel ist das Fehlen von YopT, da auf selber Höhe das V-Antigen (LcrV) und YopD laufen.

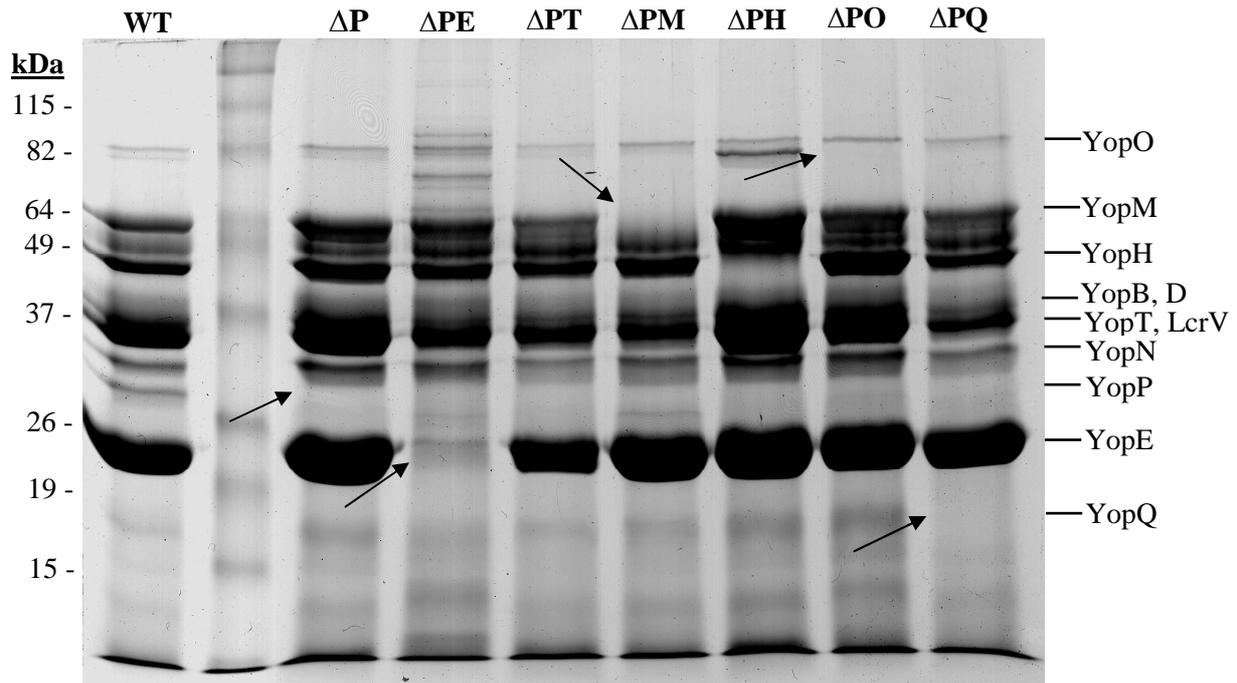


Abbildung 7: sekretierte Yop Proteine der verschiedenen *Yersinia*-Stämme im Coomassie gefärbten SDS-Gel

Die Stämme wurden bei 37 °C und unter Ca²⁺-Mangel in BHI-Medium angezüchtet und die sekretierten Proteine aus dem Überstand gefällt. Die Pfeile markieren die fehlenden Yops.

YopO und YopQ werden schwächer exprimiert und sind nur als schwache Banden im Coomassie-Gel zu erkennen. YopT wird von YopD sowie dem V-Antigen überlagert. Deshalb wurde die Deletion dieser Yops im Western-Blot mit Vergleich zum WA-314 (Wildtyp, WT) überprüft. Die Detektion erfolgte mit polyklonalen Antiseren gegen das jeweilige Yop und anschließend mit einem alkalische Phosphatase gekoppeltem Antikörper.

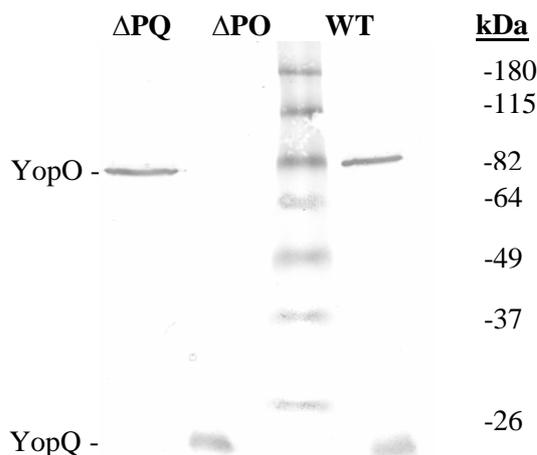


Abbildung 9: Western-Blot der ΔPO und ΔPQ-Mutanten

Die Detektion der Yops erfolgte gleichzeitig mit polyklonalen anti-YopO und anti-YopQ Antiserum (1:5000) sowie anschließend einem AP gekoppelten anti-IgG Antikörper (1:10000). Daraus resultieren beim WT zwei Banden, bei Deletionsmutanten jeweils eine.

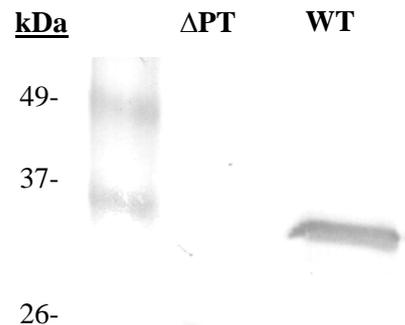


Abbildung 8: Western-Blot der ΔPT-Mutante

Die Detektion der Yops erfolgte mit polyklonalen anti-YopT Antiserum und darauf folgend einem AP gekoppelten anti-IgG Antikörper.

Zusätzlich zur Überprüfung der *yop* Deletionsmutanten im SDS-Gel und im Western-Blot wurde die korrekte Mutation mittels PCR überprüft (Daten nicht gezeigt).

C.1.2 Sekretion und Translokation des heterologen Antigens *in vitro*

Das T3SS von *Y. enterocolitica* kann neben der natürlichen Translokation von Effektorproteinen auch dazu genutzt werden, um heterologe Antigene in das Zytosol einer eukaryotischen Zelle zu translozieren. Dabei zeigten verschiedene Untersuchungen das Potential von YopE als Transporter für Fremdantigene (Rüssmann *et al.* 2000).

Das translozierte Fremdantigen ist in diesem Fall ein Fusionsprotein aus YopE, einem nicht-funktionellen Teil des Listeriolysin O (LLO) von *L. monocytogenes* sowie einem M45-Tag für den besseren *in vitro*-Nachweis des Fusionsproteins (s. Abbildung 10). Der nicht-funktionelle Teil des LLOs enthält die wichtigen CD8- und CD4-Epitope für die Immunantwort.

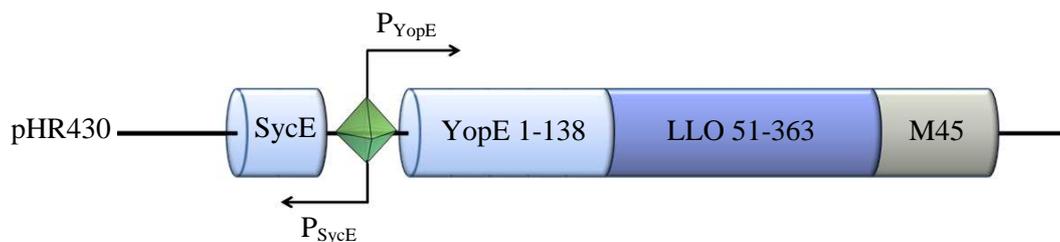


Abbildung 10: schematische Darstellung des Plasmids pHR430

Das Plasmid pHR430 enthält die genetische Information des heterologen Antigens unter dem natürlichen Promotor von YopE und dessen Chaperon SycE. Das heterologe Antigen besteht aus der Sekretions- als auch der Translokationsdomäne von YopE (AS 1-138). An das YopE Fragment ist das Listeriolysin O (LLO) mit den AS 51-363 fusioniert. Am C-terminalen Ende befindet sich das M45-Epitop, welches der Detektion durch M45 mAk dient.

Die verschiedenen *Yersinia*-Mutanten wurden mit dem Plasmid pHR430SH transformiert, mit Streptomycin (SH) selektiert und unter Sekretionsbedingungen angezüchtet (B.4.2). Die mit TCA gefällten Proteine wurden mit SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt bzw. auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die transferierten Proteine wurden mittels Antikörper (Maus anti-M45 IgG) detektiert. Als Zweitantikörper diente ein anti-Maus-IgG gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (1:5000).

Die Sekretion des Fremdantigens konnte für alle transformierten *Yersinia*-Stämme nachgewiesen werden, auch für die nicht in Abbildung 11 enthaltenen Stämme pTTSS und Δ PLcrV_{K42Q}.

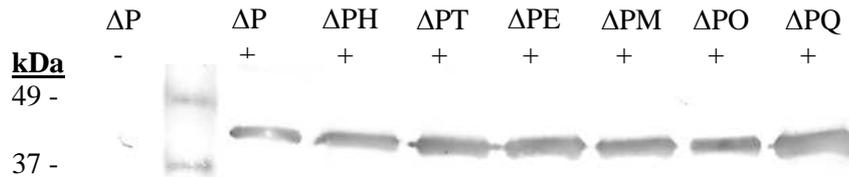


Abbildung 11: Westernblot der Sekretion des Fusionsproteins YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45

Nach Transformation des Plasmides pHR430SH in die verschiedenen Deletionsmutanten sekretierten alle das 43kDa große YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45-Fusionsprotein in den Kulturüberstand. Das + steht für das Vorhandensein des Plasmides, das - für das Fehlen. Somit diente ΔP- als Negativkontrolle.

C.1.3 *In vitro* Antigenpräsentation

Für die adaptive Immunantwort ist die Antigenpräsentation von großer Bedeutung. Die Antigene werden mit MHC-Molekülen auf der Oberfläche von APCs (insbesondere DCs) präsentiert. Der Kontakt mit einer antigenpräsentierenden APC führt über eine Aktivierung der T-Zelle zur Induktion einer T-Lymphozyten vermittelten Immunität.

Es wurde gezeigt, daß YopP die MHC-I-Präsentation inhibiert (Trülzsch *et al.* 2005). Um zu untersuchen, ob weitere Yops an der Inhibition beteiligt sind, wurde in Kooperation mit Prof. Geginat (Universität Heidelberg) mit den Einzel- und Doppelmutanten ein *in vitro* Antigenpräsentationsassay durchgeführt. Dabei dienten aus dem Knochenmark gewonnene dendritische Zellen als APCs, die mit YopE-LLO translozierenden Stämmen infiziert wurden. Nach Abtötung der Bakterien mit Gentamicin sowie mehrmaligem Waschen, wurden LLO₉₁₋₉₉-spezifische T-Zellen, die aus *L. monocytogenes* infizierten Balb/c-Mäusen gewonnen wurden, mit den infizierten Dendriten über Nacht inkubiert. Die Fähigkeit der Dendriten, das LLO₉₁₋₉₉-Peptid zu präsentieren, wurde durch die Messung der Konzentration des von den T-Zellen sekretierten IFN γ mittels ELISA bestimmt (B.5.6). Die Messung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (1h, 2h und 4h nach Infektion) sowie mit unterschiedlicher MOI (1, 10, 50 und 100) durchgeführt. Die höchsten IFN γ -Konzentrationen bzw. stärkste Stimulation wurden nach 2h bei einer MOI von 50 für alle Stämme gemessen. Eine MOI von 1 sowie eine MOI von 100 führten zu einer sehr geringen IFN γ -Ausschüttung, was einer sehr schlechten Antigenpräsentation entspricht. Gründe dafür sind z.B. eine geringe Translokation oder toxische Effekte der translozierten Yops. Als Negativkontrolle diente die YopP Deletionsmutante, die kein pHR430SH und somit kein translozierbares YopE-LLO-Fusionsprotein enthält. Erwartungsgemäß führte die Infektion mit diesem Stamm zu keiner LLO₉₁₋₉₉ spezifischen T-Zellantwort. Es zeigte sich, daß die verschiedenen Stämme hinsichtlich der Antigenpräsentation in drei Gruppen eingeteilt werden können. Die erste Gruppe zeigt eine schlechte Antigenpräsentation, die mit dem Wildtyp WA-C(pYV::CM) vergleichbar ist. Die zweite Gruppe zeigt eine signifikant höhere ($p < 0,05$) IFN γ -Sekretion nach Infektion und damit bessere Antigenpräsentation. Die dritte Gruppe besteht aus einem

einzelnen Stamm, dem alle Effektor-Yops fehlen: WA-C(pTTSS). Dieser zeigt auch eine signifikant höhere IFN γ -Sekretion nach Infektion (s. Abbildung 12).

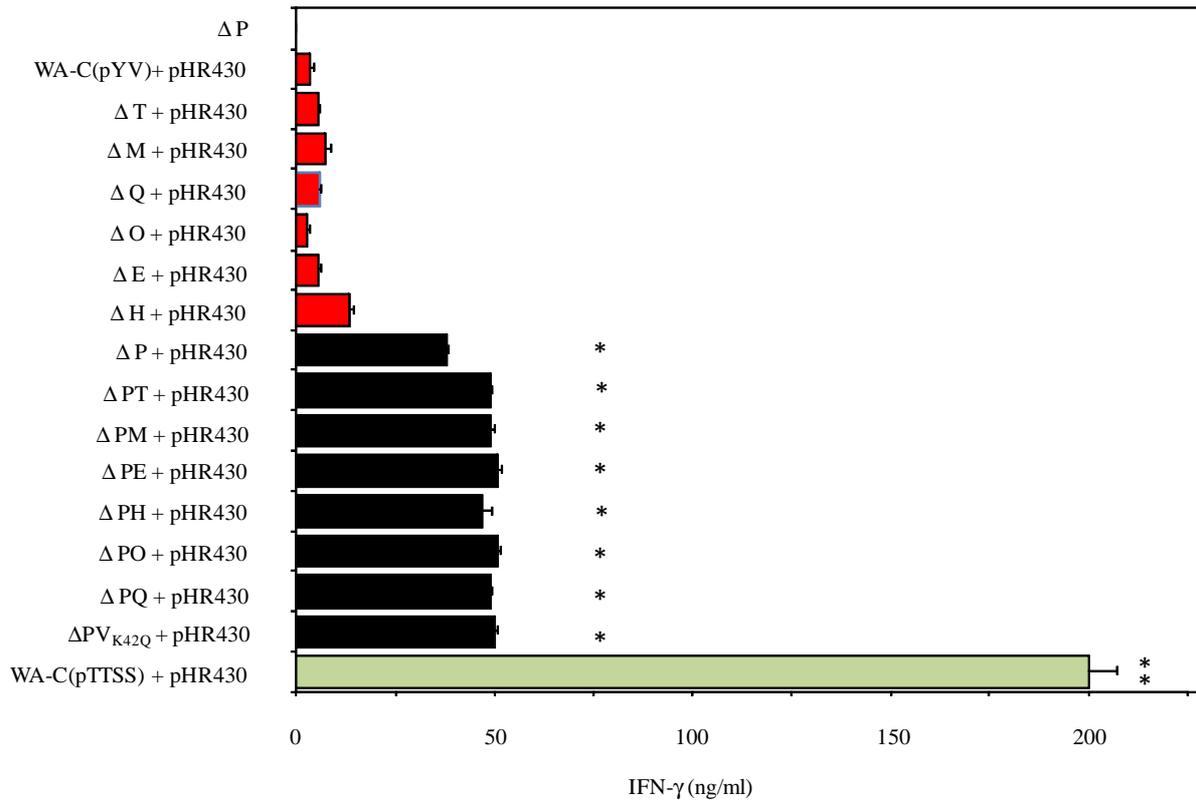


Abbildung 12: Einfluß der Yop-Deletionen auf die Antigenpräsentation in DCs

DCs wurden mit den angegebenen Stämmen einer MOI von 50 für 2h infiziert. Anschließend wurde die Präsentation des MHC Klasse-I spezifischen Epitops LLO₉₁₋₉₉ *in vitro* mit Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen untersucht. Das in den Zellkulturüberstand sekretierte IFN γ ist ein Maß für die Aktivierung der T-Zellen durch die DCs, welche abhängig von der Antigenpräsentation der DCs ist. Die 3 von einander signifikant unterschiedlichen Gruppen sind unterschiedlich eingefärbt. Ein * markiert einen signifikanten Unterschied zu WA-C(pYV)+pHR430. Ein Stamm, der mit ** markiert ist, zeigt zu allen anderen Stämmen einen signifikanten Unterschied.

C.1.4 Virulenz der *yop*-Mutanten im Mausmodell

C.1.4.1 Virulenz der *yop*-Mutanten nach oraler Infektion

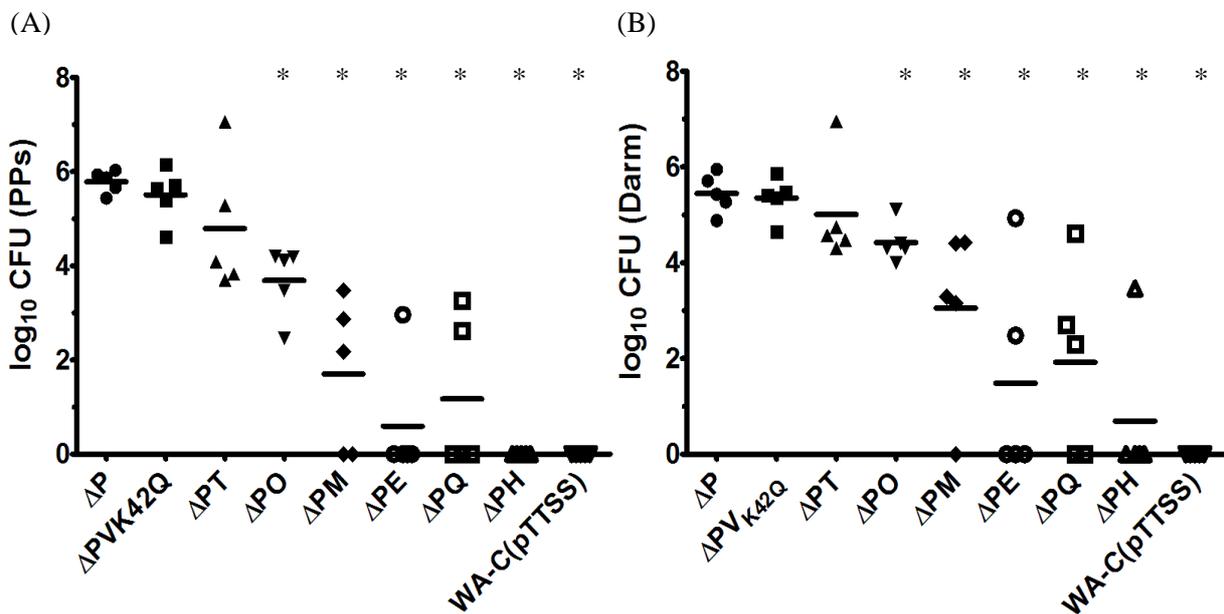
Ziel dieser Versuche war es, die Virulenz der *yop*-Deletionsmutanten bei einer Mausinfektion zu ermitteln und festzustellen, inwieweit die verschiedenen Bakterienstämme die Organe besiedeln können. Dazu wurden jeweils Gruppen von fünf Balb/c-Mäusen mit einer Dosis von 1×10^9 CFU des zu testenden *Yersinia*-Stammes oral infiziert. Am Tag 5 bzw. 7 nach Infektion wurden die Mäuse getötet und die Lebendkeimzahl der Bakterien in den entnommenen Organen bestimmt (s.B.6.3.2). Als Organe wurden die Peyer'schen Plaques, die Milz und die Leber entnommen. Außerdem wurde der Inhalt des Dünndarms ausgespült. Die homogenisierten Organe und die Darmspülung wurden in

mehreren Verdünnungsstufen auf CIN-Agar-Platten ausplattiert. Die Detektionsgrenze für die Milz und die Peyer'schen Plaques betrug 10 CFU und für die Leber und den Dünndarminhalt 50 CFU.

Die Virulenzdaten der verschiedenen Zeitpunkte unterscheiden sich einzig in der Anzahl der CFU, während das Verteilungsmuster und die Ergebnisse des Signifikanztest gleich bleiben. Somit sind die Aussagen identisch, weshalb die Daten von Tag 7 im Folgenden nicht gezeigt sind. Die Keimzahlen sind als dekadischer Logarithmus der ermittelten CFU dargestellt.

Abbildung 13 zeigt die gemessenen CFU am Tag 5 nach der oralen Infektion in den verschiedenen Geweben. Signifikante Unterschiede in Bezug auf die *yopP*-Mutante sind mit einem Stern markiert.

Deutliche Unterschiede in der Kolonisierung konnten im Dünndarm und in den Peyer'schen Plaques (PPs) festgestellt werden. Während die Infektion mit der Δ P_T- und Δ PLcrV_{K42Q}-Mutante ähnlich der Δ P-Mutante verlief, zeigte sich bei allen anderen Stämmen ein signifikanter Unterschied. Die Δ P_O-, Δ P_M-, Δ P_E- und Δ P_Q-Mutanten waren deutlich attenuierter in Bezug auf die Kolonisierung vom Darmlumen und PPs. Die Δ P_E- und Δ P_H-Mutanten besiedelten das Darmgewebe nur sporadisch. Die WA-C(pTTSS)-Mutante, die nur das YopE-LLO-Fusionsprotein transloziert, konnte nicht reisoliert werden. Die Δ P- und Δ P_T-Mutanten konnten die Leber und Milz der meisten Mäuse in geringem Maße besiedeln. Die anderen Mutanten waren dazu entweder nicht fähig oder nur sporadisch in geringer Keimzahl.



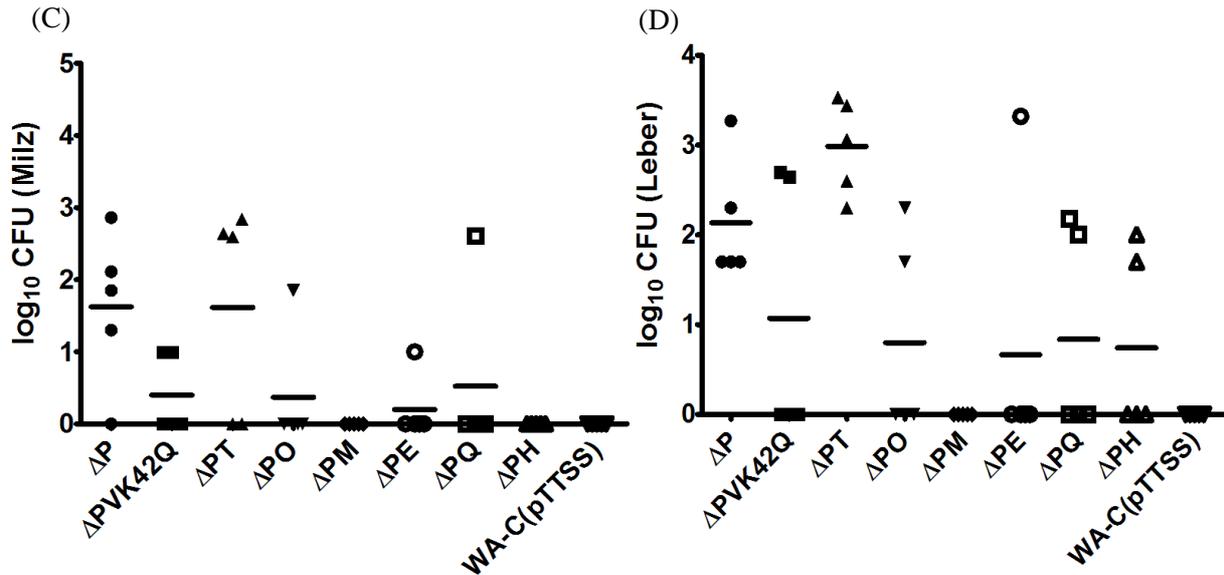


Abbildung 13: Kolonisierung nach oraler Infektion

Kolonisierung der Peyer'schen Plaques (A), des Dünndarms (B), der Milz (C) und der Leber (D) von Balb/c-Mäusen 5 Tage nach oraler Infektion mit 10^9 CFU der angegebenen und YopE/LLO/M45 translozierenden *Yersinia*-Mutante. Für jede einzelne Maus (je 5 Mäuse pro Gruppe) wurde die Keimzahl (CFU) logarithmisch dargestellt. Der Querstrich repräsentiert den Mittelwert jeder Gruppe. Ein signifikanter Unterschied (für $p < 0,05$) zwischen der *yopP* Mutante und der jeweiligen Doppelmutante ist mit einem Stern (*) markiert.

C.1.4.2 Virulenz der *yop*-Mutanten nach i.v. Infektion

Neben der oralen Infektion mit den verschiedenen Stämmen, wurde eine i.v.-Infektion durchgeführt, wodurch direkt, unter Umgehung des Gastrointestinaltrakts der Maus, eine systemische Infektion erreicht werden konnte. Durch den Vergleich mit der oralen Infektion kann festgestellt werden, ob die Attenuierung der Mutanten nur infolge einer oralen Applikation auftritt. Daraus läßt sich der Einfluss von Yops auf die Invasion in den Wirtsorganismus zu Beginn einer Infektion ableiten. Dazu wurden jeweils Gruppen von vier Balb/c-Mäusen mit einer Dosis von 4×10^4 CFU des zu testenden *Yersinia*-Stammes infiziert bzw. mit einer CFU von 4×10^6 bei WA-C(pTTSS) (s. B.6.3.1.4). Am Tag 3 wurden die Leber und die Milz entnommen, homogenisiert und die Keimzahl auf CIN-Agar-Platten bestimmt. Als Vergleichsstamm diente WA-C(pYV::CM). Abbildung 14 zeigt die logarithmisierte CFU der reisolierten Bakterien in der Milz. Dabei zeigte sich der Wildtyp als virulentester Stamm. Die Stämme $\Delta PLcrV_{K42Q}$, ΔPT , ΔPO und WA-C(pTTSS) sind im Gegensatz zu den mit einem * markierten Stämmen in Bezug auf den Stamm ΔP nicht signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Die Stämme ΔPM , ΔPE , ΔPQ , ΔPH und ΔH sind signifikant attenuiert im Vergleich zum Stamm ΔP . Der Stamm WA-C(pTTSS) wird schnell eliminiert, sowohl nach oraler, als auch nach i.v.-Gabe. An Tag 5 nach i.v.-Infektion konnte er weder in Milz noch in der Leber nachgewiesen werden. Die Werte für die Kolonisierung der Leber sind stärker gestreut (s. Abbildung 15). Hier zeigte sich nur ein signifikanter Unterschied der ΔH -Mutante und des Wildtyps WA-C(pYV::CM) im Vergleich zur ΔP -Mutante.

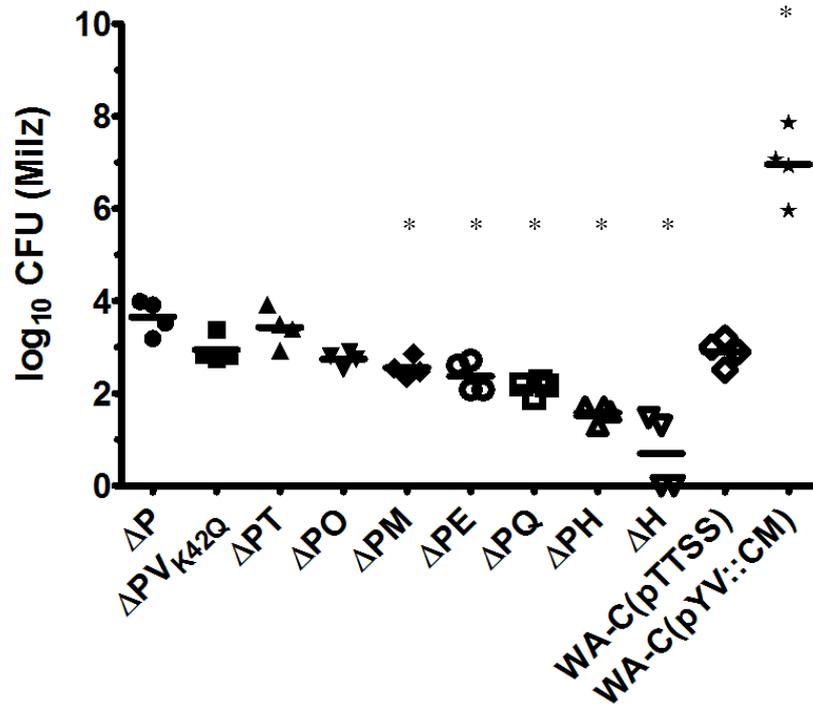


Abbildung 14: Kolonisierung der Milz nach i.v.-Infektion

Dargestellt sind die log₁₀-Titer der CFU der reisolierten Stämme aus der Milz 3 Tage nach i.v.-Infektion. Infiziert wurde -mit Ausnahme des WA-C(pTTSS)- mit einer CFU von 4x10⁴. Die CFU des WA-C(pTTSS) betrug 4x10⁶. Alle Stämme enthielten das Plasmid pHR430. Die mit Sternchen * markierten Stämme zeigen einen signifikanten Unterschied zur ΔP-Mutante an (p < 0,05).

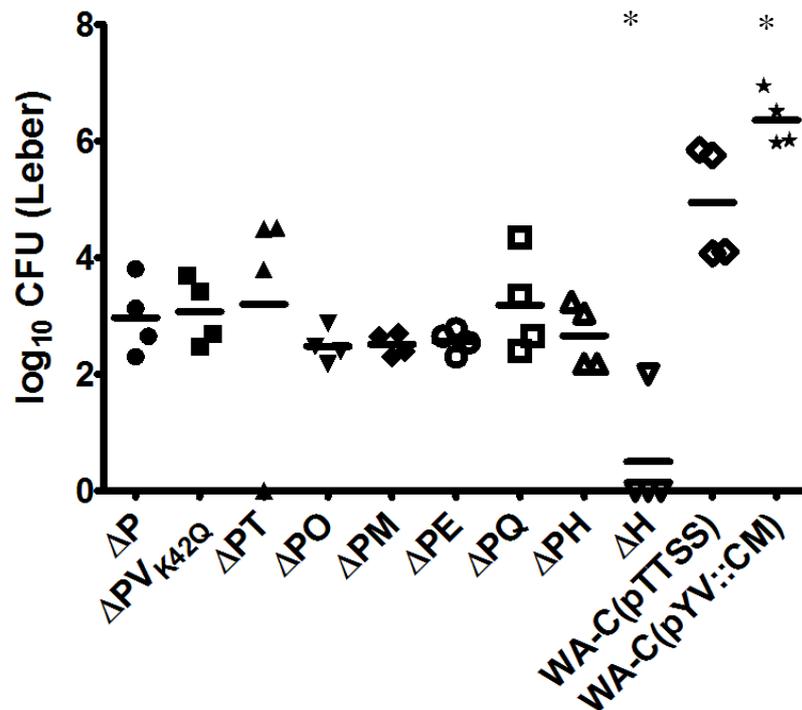


Abbildung 15: Kolonisierung der Leber nach i.v.-Infektion

Dargestellt sind die log₁₀-Titer der CFU der reisolierten Stämme aus der Leber 3 Tage nach i.v.-Infektion. Infiziert wurde mit einer Infektionsdosis von 4x10⁴ CFU; mit Ausnahme des WA-C(pTTSS). Dessen Infektionsdosis betrug 4x10⁶ CFU. Alle Stämme enthielten das Plasmid pHR430. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) zur ΔP-Mutante sind mit einem * gekennzeichnet.

C.1.5 Stabilität des pHR430-Plasmids

Die Stabilität des pHR430-Plasmides und somit auch die stabile Expression des YopE-LLO-Fusionsproteins sind bei Mausversuchen von großer Bedeutung. 7 Tage nach Infektion wurden die Bakterien aus der Milz und den Peyer'schen Plaques isoliert und auf CIN-Platten inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 50 Kolonien (pro Gewebe und Stamm) auf antibiotikahaltige CIN-Platten überimpft. Alle auf den antibiotikahaltigen Platten gewachsene Kolonien wurden ausgezählt und die Überlebensrate bestimmt. Dabei zeigte sich, daß 96-98% aller überimpften Kolonien anwuchsen und somit noch das Plasmid pHR430 beinhalteten.

C.1.6 Immunantwort auf das YopE-LLO-Fusionsprotein im Mausmodell

Das porenbildende Toxin Listeriolysin-O (LLO) von *Listeria monocytogenes* verfügt über mehrere CD4 und CD8 T-Zellepitope. Das CD8 T-Zell-Epitop LLO₉₁₋₉₉ ist dominant in Balb/c Mäusen (H-2^d) und das CD4 T-Zell-Epitop LLO₁₉₀₋₂₀₁ ist dominant in C57BL/6 Mäusen (H-2^b). Um sowohl die CD4, als auch die CD8-Antwort in einem Mausstamm zu testen, wurden die immunologischen Versuche in CB6F1-Mäusen durchgeführt. Dieser Mausstamm ist eine Kreuzung aus den Balb/c mit den C57BL/6-Mäusen. Die Immunantwort auf das LLO führt bei CB6F1-Mäusen zur Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen des Epitops LLO₉₁₋₉₉ und von CD4⁺ T-Zellen des Epitops LLO₁₉₀₋₂₀₁ (Geginat *et al.* 2001).

Die *in vivo*-Untersuchungen der zellulären Immunantwort nach Infektion auf ein transloziertes, heterologes Antigen wurden mit den YopP-Doppelmutanten, der YopP-Einzelmutante, dem Yop-losen *Yersinia*-Stamm, der nur das T3SS exprimiert und dem *Yersinia*-Wildtyp, die alle jeweils das Plasmid pHR430 enthielten, durchgeführt. Als Negativkontrolle diente die YopP-Einzelmutante ohne pHR430 und als Positivkontrolle wurde mit einer subletalen Dosis von 2×10^3 CFU *L. monocytogenes* sv1/2a EGD i.p. immunisiert. Mittels ELISpot-Assay wurde die zelluläre Immunantwort sechs Wochen nach Infektion gemessen (s.B.7.3). Dazu wurde die Anzahl der LLO₁₉₀₋₂₀₁-spezifischen CD4⁺ und der LLO₉₁₋₉₉-spezifischen CD8⁺ positiven T-Zellen durch die Anzahl der produzierten IFN γ -Spots, nach Induktion der Splenozyten mit dem entsprechendem Peptid, bestimmt.

C.1.6.1 Zelluläre Immunantwort nach oraler Infektion

Die Bestimmung der CD8 T-Zellantwort auf das translozierte Fusionsprotein YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 erfolgte nach oraler Infektion mit den Stämmen WA-C(pTTSS), Δ PE, Δ PH, Δ PM, Δ PQ, Δ PT, Δ PO, Δ PLcrV_{K42Q} und Δ P, die allesamt das Plasmid pHR430 enthielten. Ferner wurde als Vergleichsstamm mit *L. monocytogenes* sv1/2a EGD infiziert. Die Translokation des Fusionsproteins führte bei allen

Stämmen, mit Ausnahme des WA-C(pTTSS), nach Induktion der Splenozyten mit dem Peptid LLO₉₁₋₉₉ zur Stimulation IFN γ -bildender T-Zellen (s. Abbildung 16).

Dabei erreichte die Δ P-Mutante mit pHR430 ähnlich hohe Zahlen an CD8⁺ spezifischen T-Zellen nach Infektion wie eine Immunisierung mit *L. monocytogenes*. Die Gruppe der Stämme Δ PT, Δ PO und Δ PLcrV_{K42Q} erzeugten eine in etwa um die Hälfte und signifikant niedrigere Frequenz der spezifischen T-Zellen als Δ P und *Listeria*. Die Anzahl der spezifischen T-Zellen mit Δ PE, Δ PH, Δ PM und Δ PQ-infizierten Mäusen war signifikant niedriger als bei beiden vorher genannten Gruppen. Die Infektion mit dem Stamm WA-C(pTTSS) führte hingegen zu keinerlei messbaren spezifischen T-Zellantwort.

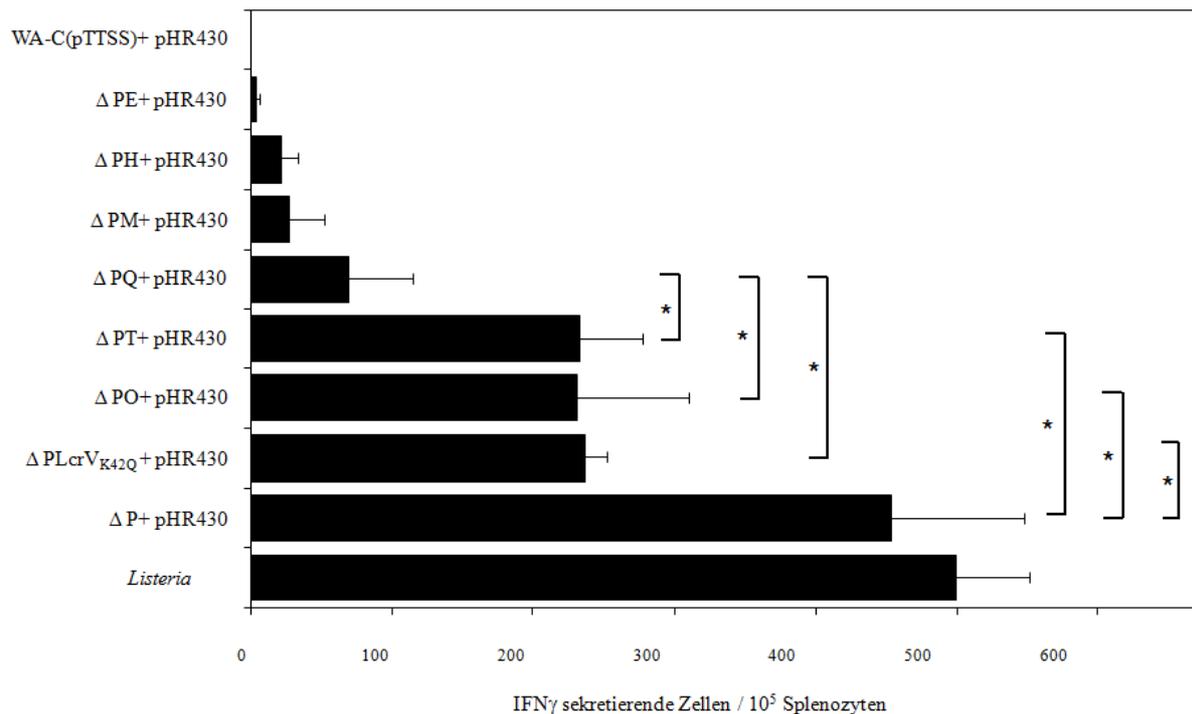


Abbildung 16: CD8 T-Zellantwort nach oraler Infektion auf das translozierte YopE-Fusionsprotein

Dargestellt ist die Anzahl der CD8⁺ spezifischen T-Zellen pro 10⁵ Splenozyten nach oraler Infektion mit 1x10⁹ CFU im Vergleich zu *L. monocytogenes* sv1/2a EGD. Die Detektionsgrenze betrug 5 IFN γ sekretierende Zellen/10⁵ Splenozyten. Ein Stern * markiert einen signifikanten Unterschied zwischen entsprechenden Gruppen ($p < 0,05$).

Die Bestimmung der CD4⁺ T-Zellantwort erfolgte parallel der Bestimmung der CD8⁺ T-Zellantwort. Induziert wurden die Splenozyten mit dem Peptid LLO₁₉₀₋₂₀₁. Wie bei der CD8⁺ T-Zellantwort führte die Translokation des Fusionsproteins bei allen Stämmen, mit Ausnahme des WA-C(pTTSS), zur Stimulation IFN γ -bildender CD4⁺ T-Zellen (s. Abbildung 17). Die Immunantwort lässt sich in zwei Gruppen unterteilen. Eine mit starker und eine mit schwacher Bildung von spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Eine starke Bildung von CD4⁺ T-Zellen wurde durch die Stämme Δ P, Δ PLcrV_{K42Q}, Δ PO und Δ PT erreicht, deren Anzahl im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen ähnlich oder höher ist. Die Ergebnisse der CD4⁺ T-Zellantwort der Stämme Δ PE, Δ PH, Δ PM und Δ PQ verhalten sich analog zu den Ergebnissen der CD8⁺ T-Zellantwort: Die Fähigkeit dieser Stämme, eine spezifische T-Zellanzahl zu induzieren, ist gering.

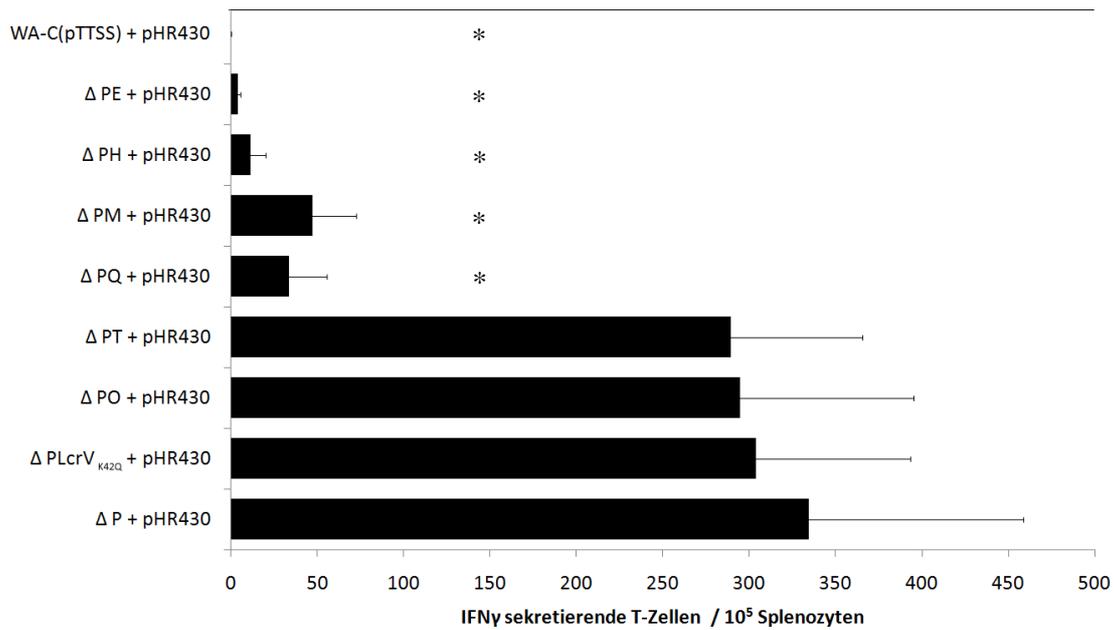


Abbildung 17: CD4⁺ T-Zellantwort auf das translozierte YopE-Fusionsprotein, nach oraler Infektion
 Dargestellt ist die Anzahl der CD4⁺ spezifischen T-Zellen pro 10⁵ Splenozyten 6 Wochen nach oraler Infektion mit 1x10⁹ CFU. Die Detektionsgrenze betrug 5 IFN γ sekretierende Zellen/10⁵ Splenozyten. Eine Kennzeichnung mit einem Stern * weist auf einen signifikanten Unterschied zur Δ P-Mutante mit pHR430 hin.

C.1.6.2 Zelluläre Immunantwort nach i.v.-Infektion

Neben dem oralen Infektionsmodell wurde die zelluläre Immunantwort nach i.v.-Infektion bestimmt. Hierbei wurde der Versuchsablauf etwas abgeändert. Die Infektion wurde wie unter C.1.4.2 beschrieben durchgeführt, aber der ELISpot-Assay wurde 16 Tage nach Infektion gestartet. 3 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse eine Woche mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin behandelt, welches an den ersten 3 Tagen (Tag 3, 4 und 5 nach Infektion) morgens i.v. appliziert wurde. Insgesamt drei weitere Gaben wurden nach je 3 Stunden i.p. gespritzt. Ab Tag 4 der Antibiotikagabe wurde Ciprofloxacin nur noch i.p. appliziert. Nach 7 Tagen Antibiotikabehandlung verging eine weitere Woche bis zur Organentnahme.

Neben der Auswertung im ELISpot-Assay wurden Aliquots der Milzzellensuspension ausplattiert, um sicherzustellen, daß keine Yersinien vorhanden sind, die das Versuchsergebnis verfälschen könnten. Alle Stämme enthalten das Plasmid pHR430 und translozieren somit das YopE-LLO-Fusionsprotein. Abbildung 18 zeigt die durch die Translokation des YopE-LLO-Fusionsproteins induzierte CD8⁺ T-Zellantwort nach i.v.-Infektion. Die Ergebnisse kann man in zwei Gruppen einteilen: Die Stämme Δ P, Δ PM, Δ PO und Δ PT zeigen nach 16 Tagen eine signifikant höhere ($p < 0,05$) Anzahl an spezifischen CD8⁺ T-Zellen als die Stämme Δ PQ, Δ PH, Δ H und WA-C(pTTSS). Letzterer induziert im Gegensatz zur oralen Infektion eine messbare spezifische CD8⁺ T-Zell Population.

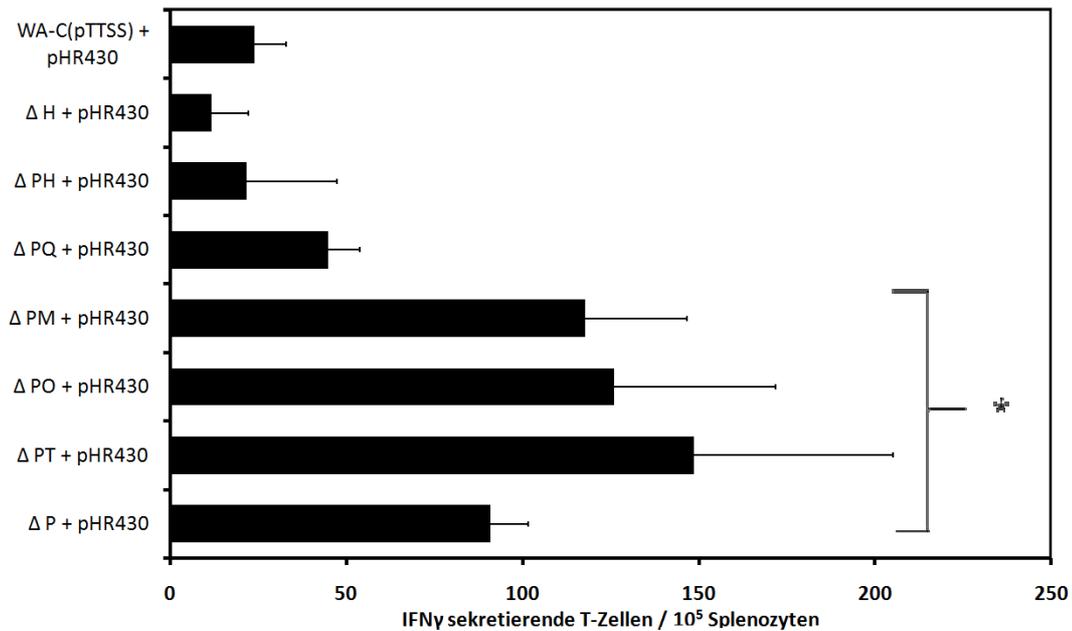


Abbildung 18: CD8⁺ T-Zellantwort auf das translozierte YopE-LLO-Fusionsprotein, nach i.v.-Infektion
 Dargestellt ist die Anzahl der CD8⁺ spezifischen T-Zellen pro 10⁵ Splenozyten nach i.v. Infektion mit 4x10⁴ CFU bzw. 4x10⁶ für den WA-C(pTTSS) je Maus. Jede Gruppe bestand aus 5 Mäusen. Die Detektionsgrenze betrug 5 IFN γ sekretierende Zellen/10⁵ Splenozyten. 3 Tage nach Infektion wurde mit Antibiotika behandelt.

C.1.7 Schutzversuche gegen eine *L. monocytogenes* Infektion

L. monocytogenes ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium, welches das Protein LLO ins Zytosol der infizierten Wirtszelle freisetzt. Die immundominanten Antigene des LLO-Proteins sind Bestandteil des YopE-LLO-Fusionsproteins des Plasmides pHR430. Somit könnte eine YopE-LLO-translozierende *Yersinia*-Mutante parallel zu der gemessenen zellulären Immunantwort auch einen nachweisbaren Schutz gegen Listerien vermitteln. Um dies zu untersuchen wurden Mäuse in Fünfergruppen mit 1x10⁹ Yersinien oral infiziert. 6 Wochen nach Infektion wurden den Mäusen 1x10⁴ CFU *L. monocytogenes* sv1/2a EGD in die Schwanzvene appliziert. 3 Tage nach Infektion wurde die Milz entnommen und die CFU der isolierten Bakterien auf PALCAM Listeria-Agar ermittelt. Als Positivkontrolle wurde mit einer sublethalen Dosis von 5x10³ *L. monocytogenes* sv1/2a EGD i.p. immunisiert. Die Negativkontrolle ist eine ΔP -Mutante ohne pHR430 Plasmid und damit ohne Listerien-spezifischen Proteine (LLO).

Die i.p. Immunisierung mit *L. monocytogenes* sv1/2a EGD sowie eine Infektion mit dem Impfstamm ΔP (mit pHR430) vermittelten einen vollständigen Schutz der Mäuse gegen eine *Listeria* Infektion. Die das YopE-LLO Fusionsprotein translozierenden Impfstämme $\Delta PLcrV_{K42Q}$, ΔPO und ΔPT vermittelten einen leichten Schutz, der durch eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Keimzahl in Bezug auf die Negativkontrolle ΔP (ohne pHR430) gekennzeichnet ist. Bei den Impfstämmen ΔPE , ΔPQ , ΔPM , ΔPH und WA-C(pTTSS) wurden sehr hohe Keimzahlen aus der Milz reisoliert, die sich nicht signifikant von dem ΔP -Impfstamm ohne transloziertem YopE-LLO Fusionsprotein unterscheiden.

Eine grafische Darstellung aller gemessenen CFU sind in Abbildung 19 zu sehen. Ein Stern * markiert einen signifikanten Unterschied zwischen entsprechenden Gruppen.

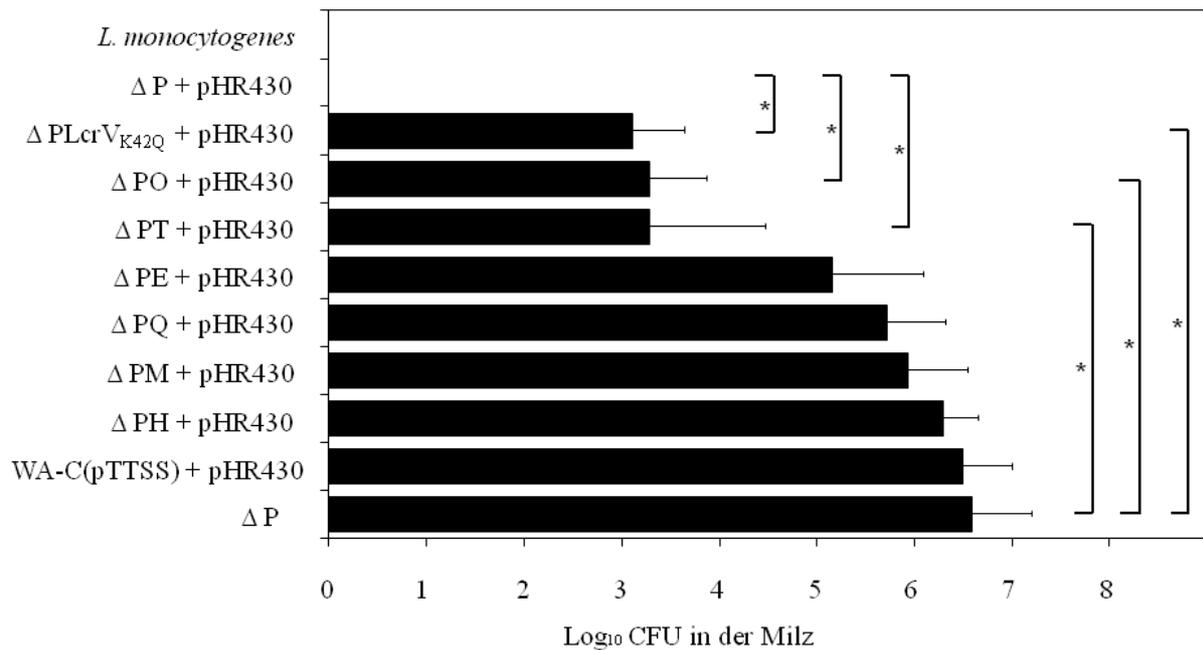


Abbildung 19: Schutzversuch gegen eine *Listeria* Infektion nach oraler Immunisierung mittels *Yersinia*-Mutanten

6 Wochen nach oraler Immunisierung mit verschiedenen *Yersinia*-Mutanten wurden diesen Mäusen 1×10^4 *L. monocytogenes* sv1/2a EGD i.v. gespritzt. 72 Stunden später wurde die Keimzahl von *Listeria* in der Milz bestimmt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Gruppen sind mit einem * gekennzeichnet. Als Negativkontrolle diente eine ΔP-Mutante ohne pHR430 und somit ohne translozierendes YopE-LLO Fusionsprotein.

C.2 LcrV-Fusionsproteine als Impfstoffträger

Bei dem Virulenz-Antigen, auch V-Antigen oder LcrV genannt, handelt es sich um ein multifunktionelles, sezerniertes und 37,5 kDa großes Protein, welches sich an der Spitze des Nadelkomplexes des T3SS befindet. In verschiedenen Immunisierungsversuchen wurde gezeigt, daß dieses LcrV-Protein ein protektives Antigen ist (Motin *et al.* 1994; Hill *et al.* 1997). LcrV induziert die Sekretion von IL-10 (Sing *et al.* 2005), welches immunsuppressiv wirkt. Durch eine Punktmutation an K42Q geht die immunsuppressorische Aktivität verloren. Ferner wurde gezeigt, daß das LcrV an den toll-like Rezeptor 2 (TLR2) bindet und in die Wirtszelle aufgenommen wird (Sing 2005). Aufgrund der Bindung an den toll-like Rezeptor 2 sowie der anschließenden Internalisierung des LcrVs, welches sich dann homogen im Zytoplasma der Wirtszelle verteilt, wurde versucht diese Eigenschaft auszunutzen, indem man an das LcrV das Protein LLO aus *Listeria monocytogenes* C-terminal fusioniert. Ziel ist es, daß dadurch das LLO mit in die Zielzelle aufgenommen werden soll. Das Fusionsprotein befindet sich dann intrazellulär und kann somit über den Weg des Proteasoms und des ERs auf MHC-I-Moleküle beladen werden. Ziel dieser Arbeit war es, durch Immunisierung mit einem

LcrV-Fusionsprotein eine CD8⁺ T-Zellantwort zu induzieren, und dadurch einen Schutz gegen Listerien, als Modellbeispiel eines intrazellulären Erregers, zu vermitteln.

C.2.1 Herstellung und Screening einer LPS-Mutante

Für die Proteinexpression wurde wie bei den *Yersinia*-Doppelmutanten eine spezielle *E. coli* –Mutante mittels ET-Klonierung (s. B.3.7) hergestellt. Dabei wurde das Gen *msbB* durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Diese Mutation stört das Wachstum von *E. coli* nicht (Karow *et al.* 1992), führt aber zu Lipopolysacchariden (LPS) mit verändertem Lipid A, dem der Myristinsäurerest fehlt. Es wurde von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, daß eine *msbB*-Mutante, im Hinblick auf die Fähigkeit Makrophagen zu aktivieren und einen septischen Schock auszulösen, sehr stark abgeschwächt ist. Als Ursprungstamm wurde *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL gewählt.

Die erzeugte Mutante wurde mit unterschiedlichen Methoden analysiert. Mittels PCR wurde das Vorhandensein der Antibiotikakassette, die Deletion des *msbB*-Gens sowie die Insertion ins *msbB*-Gen untersucht. Ferner wurde die genomische DNA extrahiert (s.B.3.1.2) und von der Kassette ausgehend ins Genom sequenziert. Diese Versuche zeigten eindeutig die Deletion des *msbB*-Gens. Durch das Fehlen des Myristinsäurerestes ist das mutante LPS kleiner als das Wildtyp-LPS. Um dies zu verifizieren wurde das LPS der beiden Stämme isoliert (s.B.3.8) und durch Elektrophorese im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Abbildung 20 zeigt das SDS-Gel nach einer Silberfärbung (s.B.4.4.2). Das mutierte LPS ist auf der mittleren Spur zu sehen, das Wildtyp-LPS auf der rechten. Deutlich zu erkennen ist der Größenunterschied zwischen den beiden Proben, was die korrekte Deletion des *msbB*-Gens im Bakteriengenom bestätigt.

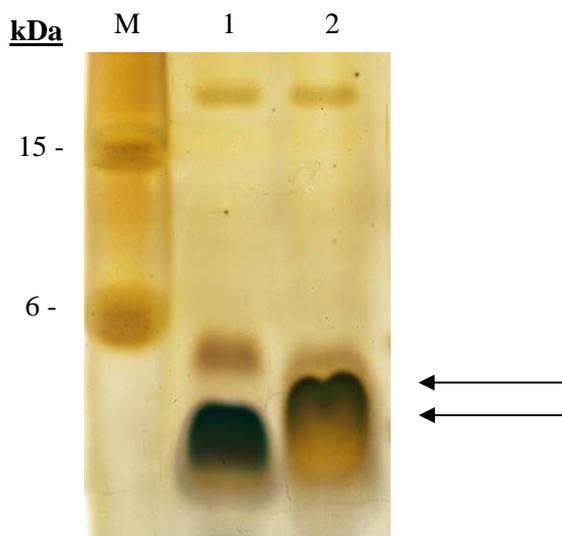


Abbildung 20: LPS-Auftrennung im SDS-Gel und anschließender Silberfärbung

Verschiedene LPS-Proben wurden mittels Elektrophorese aufgetrennt und durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. M steht für den Marker; Spur 1: die LPS-Mutante (Fehlen des *msbB*-Gens); Spur 2: das Wildtyp-LPS aus dem *E. coli* Stamm BL21. Das LPS der Mutante besitzt eine geringere Größe/Masse und läuft etwas niedriger als das des Wildtyps (veranschaulicht durch die Pfeile).

C.2.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung der (Fusions-)proteine

C.2.2.1 Klonierung der Proteine

Für die Klonierung wurde das 1002bp große LcrV ausgehend vom pYV-Plasmid des *Y. enterocolitica* Wildtyp-Stammes WA-314 mit den Primern LcrV_NdeI_for und LcrV_SstI_rev amplifiziert. Amplifiziert wurde zudem das mutante LcrV, kurz LcrV_{K42Q}, welches laut Literatur nicht mehr in der Lage ist, die IL-10-Sekretion zu induzieren (Sing *et al.* 2005). Das 495bp große LLO-Fragment wurde mit den Primern „LLO for“ und „LLO rev“ amplifiziert. Das Template war das pHR430-Plasmid (auf dem das YopE-LLO Fusionsprotein kodiert ist). Als Kontrollen wurden nur das LcrV sowie nur das LLO-Fragment kloniert. Im Falle des LLOs wurde der Forwardprimer durch den Primer LLO_Kontr_for ersetzt. Nach Subklonierung in den pGEM-Vektor wurden die Fragmente über die Restriktionsschnittstellen *NdeI+SstI* für das LcrV bzw. *SstI+HindIII* für das LLO-Fragment in den Expressionsvektor pET-21b ligiert. Der Expressionsvektor enthält die Sequenz für einen C-terminalen His₆-Tag. Die korrekte Sequenz der resultierenden Plasmide wurde mittels Sequenzierung überprüft und bestätigt.

C.2.2.2 Expression und Aufreinigung der Proteine

Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* BL21-msbB für 3h bei 27°C im Fermenter. In Vorversuchen zeigte sich, daß die Löslichkeit der LLO-haltigen Proteine stark von der Temperatur und der Länge des LLO-Fragmentes abhängt. So war bei 37°C der Großteil des Proteins unlöslich bzw. lag in inclusion bodies vor. Zur Steigerung der Löslichkeit bzw. zur Reduktion von inclusion bodies wurde zudem das LLO-Fragment, im Vergleich zu dem im pHR430 Plasmid enthaltenem LLO, leicht verkürzt. Dabei blieben alle von (Geginat *et al.* 2001) beschriebenen Epitope erhalten. Der erste Reinigungsschritt erfolgte chromatographisch über eine „Hispur Cobalt Resin“. Anschließend erfolgte eine Gelfiltration um restliche Verunreinigungen zu entfernen. Das vorhandene LPS wurde dann mittels EndoTrap® entfernt und durch den Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (kurz LAL-Test) wurde zum Schluß der Endotoxingehalt bestimmt. Proben unter 2,0pg LPS/µg Protein wurden verwendet. Abbildung 21 zeigt die aufgereinigten Proteine. Sie besitzen alle einen C-terminalen His₆-Tag. Ferner besitzen Protein 1 (das LLO-Fragment) und Protein 2 (das LcrV) kurze Fragmente der MCS des pET21b-Vektors. Spur 3 und 4 enthalten die LcrV-LLO-Fusionsproteine. Spur 3 das natürliche Lcrv und Spur 4 das an K42Q mutierte LcrV.

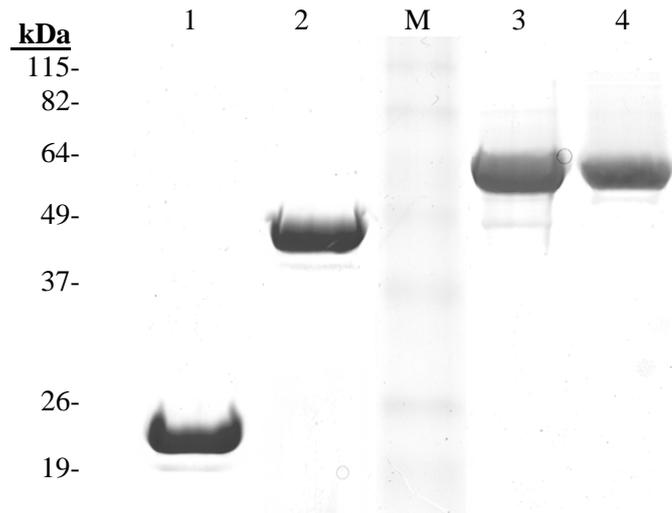


Abbildung 21: SDS-Gel mit den aufgereinigten Proteine für Immunisierungsversuche (Coomassie gefärbt)
 Spur 1: LLO₇₅₋₃₀₆-Fragment; Spur 2: LcrV; Spur 3: LcrV-LLO Fusionsprotein; Spur 4: Fusionsprotein aus LcrV_{K42Q} und LLO

C.2.3 Immunantwort auf LcrV-LLO-Fusionsproteine im Mausmodell

C.2.3.1 Immunisierungen

In den ersten Immunisierungsexperimenten wurde untersucht, welche Applikationsart sich am besten eignet bzw. die größten Erfolgsaussichten verspricht. Dazu wurden die Proteine i.p. und s.c. ohne Zugabe von Adjuvantien insgesamt drei Mal gespritzt: Tag 0, Tag 3 und Tag 7. Vier Wochen nach Erstimmunisierung wurde die Milz von jeder Maus entnommen. Es zeigte sich im ELISpot-Assay als auch durch FACS-Analysen, daß durch i.p.-Immunisierung mit 20µg Protein äquivalent zu LLO eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Anzahl von spezifischen T-Zellen erzielt wurde als durch eine subkutane Gabe. In folgender Grafik (Abbildung 22) ist die prozentuale Anzahl von LLO-spezifischen CD8⁺ T-Zellen an den Splenozyten in % auf der Ordinate aufgetragen. Der Übersicht halber fehlen in dieser Grafik die Werte für eine Immunisierung mittels lebender *L. monocytogenes* (dieser Wert betrug im Mittel 0,0997 % bei einer Standardabweichung von 0,0383). Dieser Vergleich zwischen den beiden Applikationsformen zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der i.p.- und der s.c.-Gabe des LcrV-Fusionproteins VgLLO.

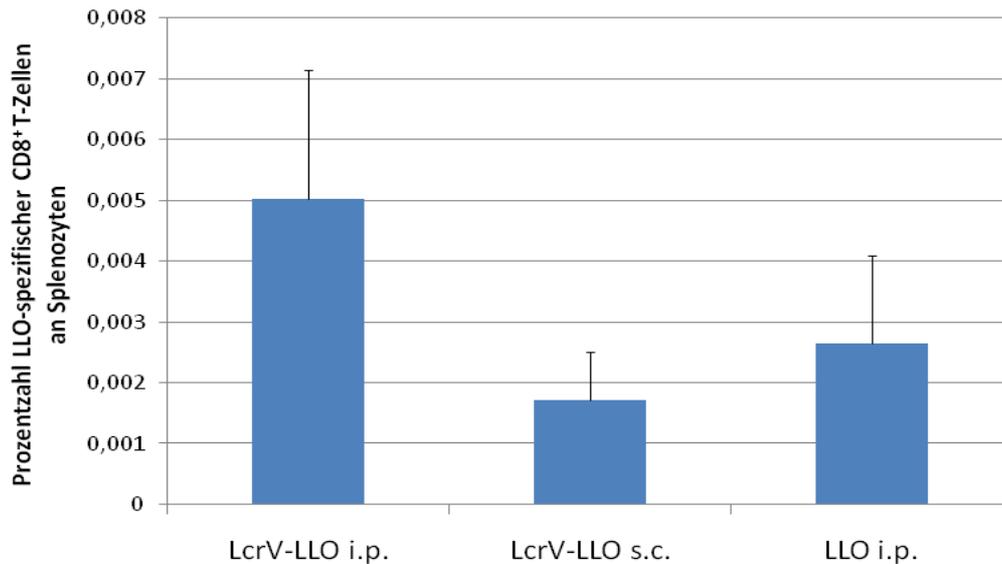


Abbildung 22: FACS-Analyse zur Applikationsart für Protein-Immunisierungen

FACS-Analyse von Milzzellen nach verschiedener Applikationsart des LcrV-LLO-Fusionsproteins. Die Proteine wurden i.p. oder s.c. gespritzt. Als Kontrolle diente das Protein LLO.

Weitere Versuche zeigten, daß mittels Zugabe von inkompletten Freundschens Adjuvans (IFA) und der Erhöhung der Proteinmenge die Immunantwort verbessert werden konnte. Daraufhin wurden alle weiteren Immunisierungsexperimente mit intraperitonealer Applikation der mit IFA versetzten Proteine durchgeführt. Zudem wurde die Menge an Protein verüffacht.

Parallel dazu wurde das LcrV-Fusionsprotein unter Regulation des natürlichen LcrV-Promotors kloniert. Eine YopP-Mutante wurde mit diesem Vektor (pVL) transformiert und auf Sekretion des LcrV-LLO-Proteins untersucht. Es zeigte sich, daß die Expression und Sekretion vergleichbar mit der des natürlichen LcrVs war.

C.2.3.2 Messung der CD4 und CD8 T-Zellantwort mit ELISpot-Assay

Als nächstes sollte untersucht werden, inwieweit die Immunisierung (i.p.) zur Aktivierung und Proliferation von CD8⁺ T-Zellen führt. Dazu wurde ein ELISpot-Assay durchgeführt und die Anzahl an LLO-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bestimmt, die aufgrund der LLO-Peptidstimulierung IFN γ sekretieren.

Die Proteine wurden mit IFA versetzt und mit 100 μ g LLO (bzw. diesem äquivalent) i.p. gespritzt. Booster-Immunisierungen wurden an Tag 3 und Tag 7 durchgeführt. Vier Wochen nach Erstimmunisierung wurde die Milz jeder Maus entnommen und ein ELISpot-Assay gemacht (B.7.3).

Für diesen Versuch wurden folgende Proteine getestet:

1. das LcrV-Fusionsprotein LcrV-LLO
2. das LcrV_{K42Q}-LLO Fusionsprotein

3. eine Mischung aus dem LcrV und dem LLO-Kontrollprotein (keine kovalente Bindung!)
4. das LLO₇₅₋₃₀₆-Kontrollprotein

Als Kontrolle dienten nicht immunisierte Mäuse.

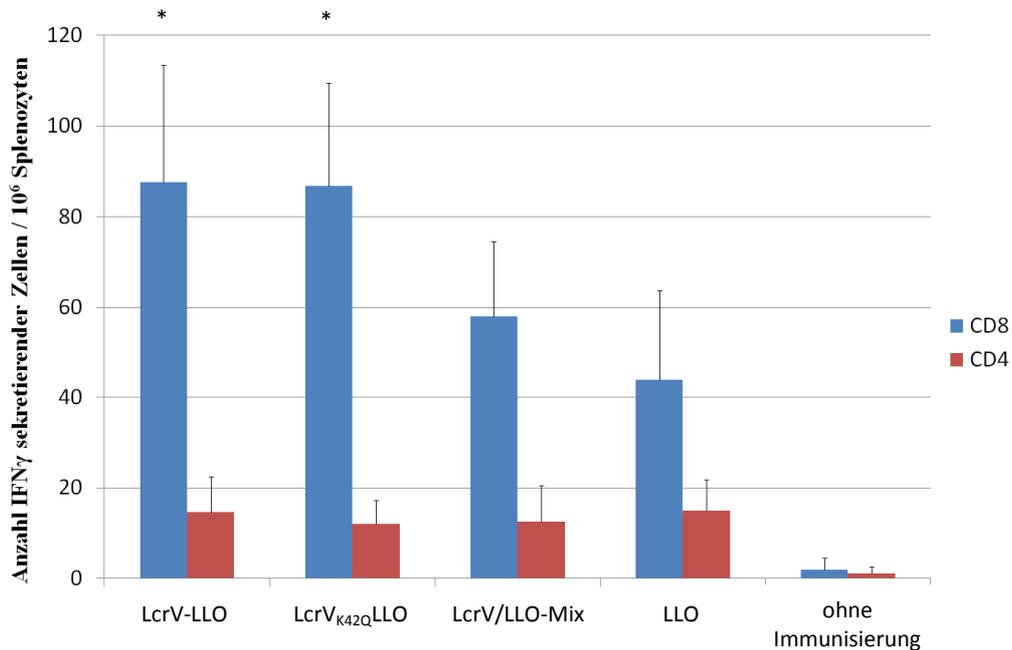


Abbildung 23: CD8 und CD4 Antwort im Elispot-Assay nach Immunisierung mit verschiedenen Proteinen
Anzahl der CD8 bzw. CD4 induzierten T-Zellen nach Immunisierung mit verschiedenen Proteinen: (1) das LcrV-LLO-Fusionsprotein, (2) das LcrV-LLO-Fusionsprotein mit der K42Q-Mutation im LcrV, (3) das Proteingemisch aus LcrV und LLO₇₅₋₃₀₆, (4) das LLO₇₅₋₃₀₆-Kontrollprotein. * zeigen einen signifikanten Unterschied zur LLO₇₅₋₃₀₆-Kontrollgruppe an ($p < 0,05$).

Die, durch die Immunisierung mittels verschiedener Proteine, induzierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind in Abbildung 23 dargestellt. Es zeigte sich, daß alle Proteine LLO-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen induzieren können. Entscheidend für einen Schutz gegen intrazelluläre Erreger sind die CD8⁺ T-Zellen. In der Fähigkeit, diese zu induzieren, gibt es Unterschiede. Die Anzahl der durch die beiden LcrV-Fusionsproteine induzierten CD8⁺ T-Zellen ist signifikant ($p < 0,05$) höher als die der LcrV/LLO-Mischung als auch die der beiden Kontrollgruppen mit LLO₇₅₋₃₀₆ und den naiven Mäusen. Zwischen den Gruppen die mit dem LcrV/LLO-Gemisch und mit LLO₇₅₋₃₀₆ immunisiert wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die CD4⁺-Antwort ist innerhalb der immunisierten Mäuse ähnlich stark und zeigt keinerlei signifikante Unterschiede; mit Ausnahme zur Kontrollgruppe der nicht immunisierten Mäuse.

Eine CD4 und CD8 T-Zellantwort gegen LLO nach oraler Verabreichung der YopP-Mutante mit pVL-Plasmid (LcrV-LLO-Fusionsprotein unter natürlichem Lcr-Operon) konnte nicht gemessen werden.

C.2.3.3 Messung der CD4 und CD8 T-Zellantwort mittels FACS-Analyse

Neben den ELISpot-Experimenten wurden FACS-Untersuchungen durchgeführt. Diese Methode erlaubt es, antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen direkt *ex vivo* und ohne weitere Manipulation zu analysieren. Dabei werden fluoreszenzmarkierte, tetramere Peptid-MHC-I-Komplexe, kurz Tetramere genannt, als Sonden eingesetzt, die antigenspezifische T-Zellen stabil markieren (s. B.7.4.1). Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 1 aus 5.000 Zellen (Constantin *et al.* 2002) und erlaubt somit auch den Nachweis zytotoxischer T-Zellen in geringer Konzentration. Mithilfe der Tetramerfärbung und weiteren Oberflächenmarkern ist eine sehr spezifische Analyse von CD8⁺ T-Zellen möglich. Dabei kann zwischen T_{CM} (*central memory t-cell*) und T_{EM} (*effector memory t-cell*), die beide zu den Gedächtniszellen gehören, sowie T_E (*effector t-cell*) unterschieden werden. T_{CM} können sehr schnell nach Antigenkontakt proliferieren, zeigen jedoch keine sofortige Effektorfunktion. Im Gegensatz dazu weisen T_{EM} ein schwaches Proliferationsvermögen auf, sind aber zu einer sehr starken und schnellen Effektorfunktion befähigt. In dem Modell von Busch und Oxenius ist die T_{EM}-Population die wichtigste, schützende Subpopulation, die sich zu funktionellen T_E differenzieren kann (Bachmann *et al.* 2004; Huster *et al.* 2006).

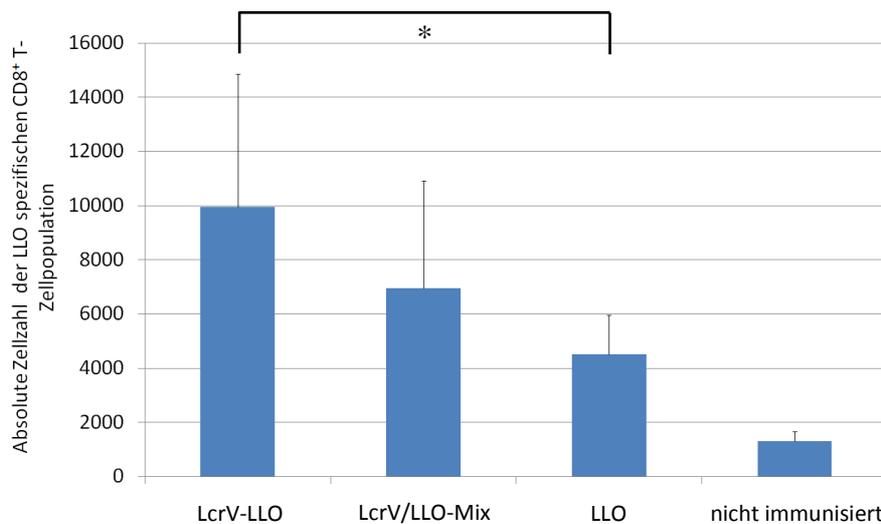


Abbildung 24: FACS-Analyse: absolute Zellzahl LLO spezifischer CD8⁺ T-Zellen pro Milz

4 Wochen nach Immunisierung von CB6F1-Mäusen mit dem LcrV-LLO-Fusionsprotein, dem LLO sowie einer Mischung aus LcrV und LLO wurden die Milzen entnommen und mittels FACS die absolute Zellzahl LLO spezifischer CD8⁺ T-Zellen ermittelt. Ein * markiert einen signifikanten Unterschied zwischen der Immunisierung mit LLO₇₅₋₃₀₆ und dem LcrV-LLO Fusionsprotein.

Neben dem ELISpot-Assay konnte auch mittels FACS ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen einer Immunisierung mit dem LcrV-LLO-Fusionsprotein und der alleinigen Gabe von LLO₇₅₋₃₀₆ festgestellt werden (s. Abbildung 24). Zwischen dem Fusionsprotein und der LcrV/LLO-Mischung sowie der Mischung und dem LLO₇₅₋₃₀₆ konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die absolute Zellzahl der LLO spezifischen CD8⁺ T-Zellen pro Milz nach einer *Listeria*

Wildtyp-Infektion (Dosis betrug 5×10^3 i.p.) lag in etwa beim Dreifachen der durch das LcrV-LLO-Fusionsprotein induzierten Zellzahl.

Die Verteilung der T-Zell-Populationen ist in allen drei Fällen sehr ähnlich. Die durchschnittliche prozentuale Verteilung der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen innerhalb der $CD8^+$ T-Zellen ist in der Gruppe der Protein-Immunisierung nahezu identisch. Ca. 60% sind T_{EM} , ca. 33 % sind T_{CM} und 5% T_E , wie in exemplarisch in

Abbildung 25 dargestellt wird. Eine *L. monocytogenes* Immunisierung bringt eine prozentual größere, und für einen Schutz wichtige, T_{EM} und T_E -Population und somit eine kleinere T_{CM} -Population hervor.

Die murinen Gedächtniszellpopulationen sind durch folgende Oberflächenmarker gekennzeichnet: T_{CM} : $CD127^+ / CD62L^+$, T_{EM} : $CD127^+ / CD62L^-$.

Die Effektor T-Zellen (T_E) exprimieren keinen der beiden Marker: T_E : $CD127^- / CD62L^-$ (Huster *et al.* 2004).

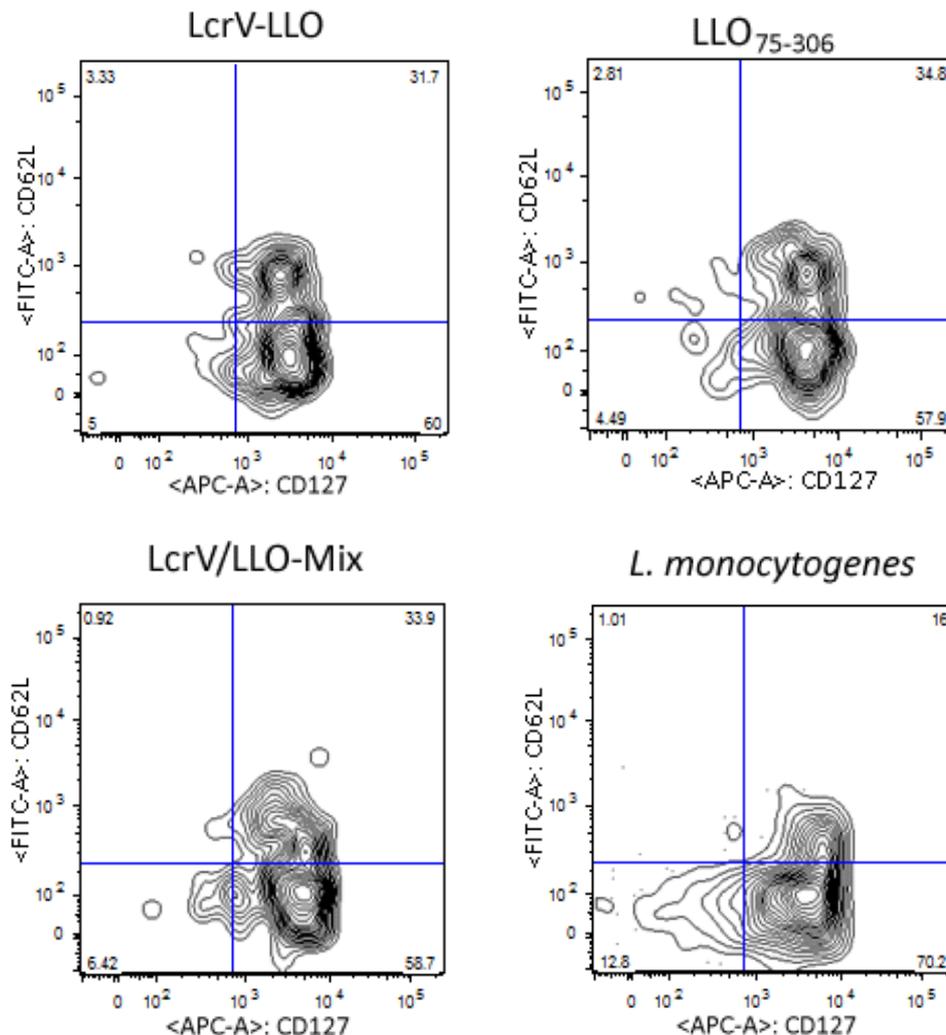


Abbildung 25: Vergleich der prozentualen Verteilung der T-Zell-Subpopulationen

Exemplarisch sind für die verschiedenen Immunisierungen die jeweils resultierenden $CD8^+$ T-Zell-Subpopulationen nach der FACS-Analyse dargestellt. Der Unterschied zwischen einer Immunisierung mittels Protein und lebenden *L. monocytogenes* zeigt sich in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Subpopulation. In jedem Diagramm befinden sich oben rechts T_{CM} , unten rechts T_{EM} und unten links die T_E -T-Zell-Population. Die Zahlen in jedem Quadrat geben den Prozentsatz der T-Zell-Subpopulationen innerhalb der $CD8^+$ T-Zellen wieder.

C.2.3.4 Schutzversuche gegen eine *L. monocytogenes*-Infektion

Nachdem im ELISpot-Assay und mittels FACS-Analyse gezeigt werden konnte, daß durch die i.p. Immunisierung mit LLO-Proteinen die Bildung LLO₉₁₋₉₉-spezifischer CD8⁺ T-Zellen induziert werden konnte, wurde untersucht, ob daraus ein ausreichender Schutz gegen eine *Listeria*-Infektion resultiert. Vier Wochen nach Immunisierung mit diversen Proteinen, wurden die Mäuse mit einer Dosis von 1x10⁴ *L. monocytogenes* i.v. infiziert. Drei Tage später wurde die Milz entnommen und die Keimzahl der lebenden Listerien ermittelt.

In Abbildung 26 ist das Ergebnis der Belastungsinfektion / des Schutzversuches als Vergleich der Keimzahlen von Listerien in der Milz dargestellt. Die mit Protein immunisierten Mäuse zeigen als Gruppe eine signifikant niedrigere Keimzahl in der Milz als die Gruppe der nicht immunisierten Tiere. Innerhalb der 3 mit Protein immunisierten Gruppen ist kein signifikanter Unterschied feststellbar. Es zeigt sich nur eine der CD8⁺ Antwort analoge Tendenz. Die geringste Keimbelastung in der Milz durch Listerien wurde bei den mit LcrV-LLO-Fusionsprotein immunisierten Tieren festgestellt.

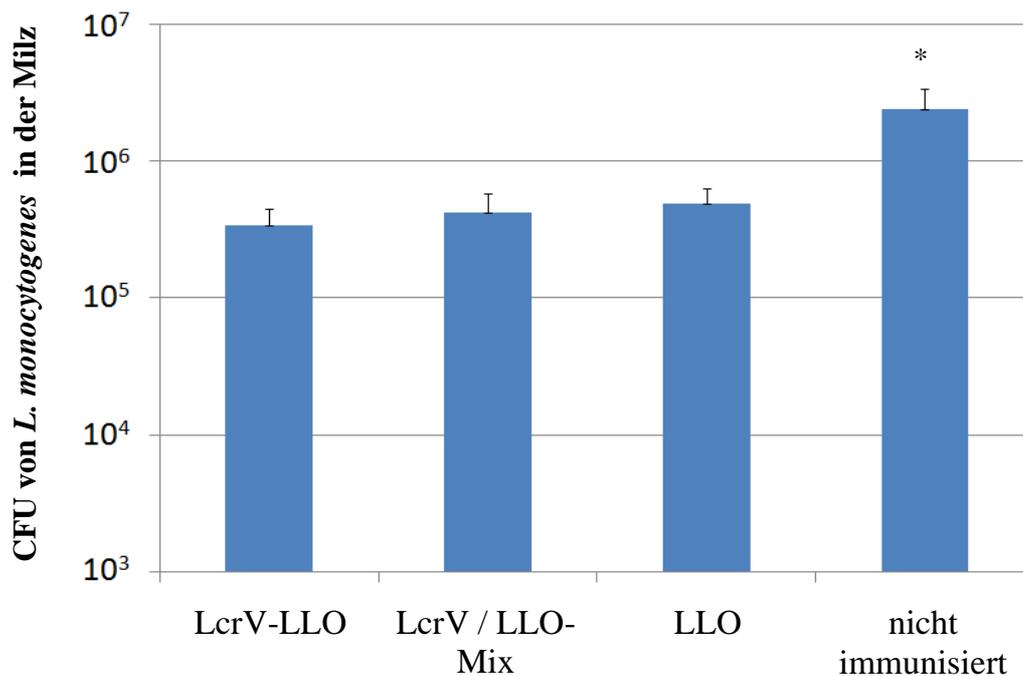


Abbildung 26: Keimzahlbestimmung in der Milz nach Belastungsinfektion mit *L. monocytogenes*

Nach Immunisierung mit den verschiedenen Proteinen wurde eine Belastungsinfektion mit *L. monocytogenes* durchgeführt. 3 Tage nach Infektion wurden die Milzen entnommen und die Keimzahl (CFU) bestimmt. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen den Proteinimmunisierungen nicht ermittelt werden, dafür aber zur Negativkontrolle (markiert mit *).

D DISKUSSION

Ein vielversprechender Ansatz bei der Entwicklung neuer Impfstoffe ist der Einsatz von bakteriellen Lebendvakzinen, die oral verabreicht werden können. Es konnte gezeigt werden, daß sich viele verschiedene Erreger dazu eignen, als Vektoren für die Translokation fremder Antigene zu fungieren und eine gute Immunantwort hervorzurufen (Medina *et al.* 2001). Ein dabei weit verbreiteter Mechanismus ist die Translokation des Antigens in das Zytosol der Wirtszelle mittels Typ-III-Sekretionssystemen, wie sie z.B. in *Salmonella* und *Yersinia* vorkommen. Mit *Salmonella typhimurium* Mutanten konnten erfolgreiche Impfungen gegen bakterielle Erreger durchgeführt werden. Mit *Yersinia* Mutanten gelang dies zu einem gewissen Grad, jedoch waren diese Mutanten zu virulent, worin aber auch das Potential für Verbesserungen und Weiterentwicklungen liegt.

Bisherige Untersuchungen belegen, daß Yop Effektorproteine und das V-Antigen durch Modulation von eukaryotischen Zellstrukturen Einfluß auf die Immunantwort des Wirtsorganismus nehmen (Cornelis 2002). Ferner ist belegt, daß YopP nicht nur der angeborenen Immunantwort entgegenwirkt, sondern auch auf das adaptive Immunsystem durch die Hemmung der CD8⁺ T-Zell-Entwicklung Einfluss nimmt (Trülzsch *et al.* 2005). Das Eliminieren weiterer Yop Effektorproteine auf Basis eines Δ YopP-Impfstammes auf DNA-Ebene sollte folglich zu einer weiteren Abschwächung der Virulenz führen und eine veränderte Immunantwort gegen *Yersinia* bewirken.

Neben Lebendvakzinen besteht die Möglichkeit mittels Totimpfstoffen einen Immunschutz zu erreichen (Yeremeev *et al.* 2003). Die Möglichkeit, daß das Protein nach Applikation sich selbst in die Immunzellen einschleusen kann, wäre für die Immunisierung gegen intrazelluläre Erreger ein bedeutender Schritt. Das LcrV, auch V-Antigen genannt, von *Y. enterocolitica* bindet laut Literatur an den TLR2-Rezeptor und vermittelt dadurch seine eigene Aufnahme über Vesikel ins Zytosol der Wirtszelle (Sing 2005). Diese Translokator Eigenschaft birgt das Potential durch Fusionierung mit bestimmten Antigenen einen zellulären Immunschutz vermitteln zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendung von *Y. enterocolitica* als Lebendvakzin im Mausmodell sowie das Potential des LcrV als Antigen-Translokator für TLR2-positive Zellen untersucht. Hierfür wurden zum einen rekombinante Yersinien hergestellt, die ein YopE-LLO-Fusionsprotein translozieren können. Zum anderen wurden rekombinante Fusionsproteine aus dem LcrV und dem LLO hergestellt. Nach Immunisierung wurde die vermittelte Schutzantwort eingehend untersucht und charakterisiert, um gegebenenfalls Ansatzpunkte für eine weitere Optimierung bestimmen zu können.

D.1 Einfluss der Yop Effektorproteine auf Virulenz und Antigenpräsentation

D.1.1 Konstruktion genetisch stabiler *yopP* Deletionsdoppelmutanten

Zur Untersuchung der Virulenzeigenschaften und der immunologischen Aktivität der verschiedenen Yop Proteine sowie der weiteren Attenuierung, wurden verschiedene *yop* Deletionsmutanten auf Basis des bestehenden *yopP* Deletionsstammes von *Y. enterocolitica* O:8 (Biovar 1B) hergestellt (s.C.1.1). Neben den Genen YopE, YopT, YopO, YopH, YopM wurde das Gen YopQ, welches an der Translokation der Yop Effektorproteine beteiligt ist, mittels homologer Rekombination deletiert. Ferner wurde eine Mutation in das LcrV-Gen eingeführt, wodurch das LcrV keine immunsuppressive Wirkung mehr aufweist (Sing *et al.* 2005).

Das jeweilige Gen wurde mit Hilfe homologer Rekombination eines entsprechenden PCR-Fragmentes durch eine Antibiotikakassette ohne Terminatorstruktur ersetzt, um keinen Einfluss auf die Transkription nachfolgender Gene zu nehmen. Um weitere unerwünschte Effekte auszuschließen (falsche Rekombination, chromosomale Defekte u.ä.), wurden die rekombinanten pYV-Plasmide isoliert und in einen pYV-losten *Yersinia*-Stamm (WA-C) transformiert. Die rekombinanten Stämme wurden durch 37°C und Ca²⁺-Mangel zur Sekretion von Yop Proteinen in den Kulturüberstand angeregt. Diese sekretierten Yops wurden mittels SDS-PAGE nachgewiesen und kontrolliert, ob die jeweilige Deletion erfolgreich war und die restlichen Yops korrekt exprimiert wurden (Heesemann *et al.* 1983). Dabei konnte gezeigt werden, daß die Mutagenese keinerlei Auswirkung auf die Menge der Sekretion der nicht deletierten Yops hatte (s. C.1.1). Neben der Proteinexpression bzw. –sekretion, wurden die Mutationen durch PCR und Western-Blot bestätigt.

D.1.2 Sekretion des YopE-LLO-Fusionsproteins

Das Potential von YopE als Transporter für heterologe Antigene wurde in verschiedenen Studien aufgezeigt (Sory *et al.* 1995; Schesser *et al.* 1996; Rüssmann *et al.* 2000). Es wurde ferner durch Fusionen von verkürztem YopE mit verschiedenen Proteinen gezeigt, daß die minimale, für eine Sekretion erforderliche, Sequenz aus den N-terminalen AS 1-15 besteht (Sory *et al.* 1995; Schesser *et al.* 1996). Rüssmann *et al.* verwendete verschiedene Fusionen von YopE mit dem p60 Protein aus *L. monocytogenes* und zeigte, daß die Fusionsproteine mit den N-terminalen AS 1-138 von YopE am effizientesten transloziert wurden (Jacobi *et al.* 1998; Rüssmann *et al.* 2000). Um die Immunantwort auf das heterologe Antigen zu untersuchen, wurden die *yop* Deletionsmutanten mit dem Plasmid pHR430 transformiert und die Expression und Sekretion des Fusionsprotein mittels Western Blot kontrolliert (s. C.1.2). Für *Y. pseudotuberculosis* sowie für verschiedene *Y. enterocolitica yop* Deletionsmutanten konnte die Sekretion und Translokation bereits nachgewiesen werden (Rüssmann

et al. 2003; Trülzsch *et al.* 2005). Um eine Immunantwort auszulösen ist eine stabile Expression des YopE-LLO-Fusionproteins von Nöten, die ihrerseits von der Stabilität des Plasmides abhängt. So wurden 7 Tage nach Infektion parallel zur Keimzahlbestimmung die aus der Maus reisolierten Bakterien auf das Plasmid pHR430 getestet. Mindestens 96 % der reisolierten Bakterien enthielten dabei das Plasmid. Somit war die Stabilität des Plasmides in *Y. enterocolitica* für weitergehende Untersuchungen im Mausinfektionsmodell gewährleistet.

Diese Untersuchungen bestätigten das Potential von YopE-Fusionsproteinen und des Typ-III-Sekretionssystems von *Y. enterocolitica*, Fremdproteine in das Zytosol von APCs zu bringen.

D.1.3 Einfluß der Yops auf die Antigenpräsentation dendritischer Zellen

Das Typ III Sekretionssystem ermöglicht es, Effektorproteine gezielt in das Zytosol eukaryotischer Zellen einzuschleusen. Die daraus resultierenden Auswirkungen durch die Effektorproteine ermöglichen das extrazelluläre Überleben und die Proliferation von *Y. enterocolitica* im Wirtsorganismus. APCs sind die Initiatoren und Modulatoren der Immunantwort und stimulieren B- und T-Zellen. Zur Aktivierung von T-Zellen müssen Proteine durch APCs prozessiert und auf deren Oberfläche präsentiert werden (Banchereau *et al.* 1998). Da APCs zum primären Ziel der Yops gehören (Marketon *et al.* 2005), führt eine Inhibition der Prozessierung und/oder Präsentation zytosolischer Proteine zu einer verminderten Stimulation des Immunsystems bzw. der T-Zellen.

Für YopE, YopT, YopO und YopH konnte eine Hemmung der Phagozytose durch Makrophagen und PMNs gezeigt werden (Grosdent *et al.* 2002). Desweiteren konnte für YopP eine Apoptose-induzierende Wirkung und eine Inhibierung der Antigenpräsentation in DCs nachgewiesen werden (Erfurth *et al.* 2004). In DCs wird die Antigen degradation möglicherweise durch Interaktion mehrerer Yops inhibiert (Adkins *et al.* 2008). Durch die Deletionsmutanten konnte untersucht werden, welches Yop bei dem komplexen Ablauf der Antigenpräsentation Einfluß nimmt. Es wurde die Fähigkeit von Knochenmark-DCs untersucht, das Peptid LLO₉₁₋₉₉ spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Infektion mit verschiedenen *Yersinia* Mutanten, die das heterologen Antigen YopE-LLO-M45 translozieren, zu präsentieren. Es konnte nachgewiesen werden, daß eine Infektion mit dem Yop-losen, aber YopE-LLO-M45 translozierendem Stamm, WA-C(pTTSS) eine signifikant höhere MHC-I Antigenpräsentation in DCs hervorruft. Die Abhängigkeit der Antigenpräsentation von YopP zeigte sich in der Gruppe der YopP translozierenden Stämme. Hier ist die Stimulation von T-Zellen sehr gering, was auf eine schwache Antigenpräsentation von DCs zurückzuführen ist. Eine YopP Mutante zeigt eine erhöhte Antigenpräsentation. Weitere Deletionen von Yops (YopH, YopE, YopT, YopM, YopO, YopQ) führten in einer YopP Mutante zu einer geringfügigen, aber reproduzierbaren Erhöhung der MHC-I Antigenpräsentation. Möglicherweise ist neben YopP auch das Zusammenspiel mehrerer Yops, wie bei der Antigen degradation, verantwortlich.

D.1.4 Virulenzstudien im Mausinfektionsmodell

Um nach einer Infektion die weitere Besiedelung des Wirtsorganismus und das Überleben von *Yersinia* zu sichern, sind Yops unverzichtbar. Welchen Einfluss Yops auf die Virulenz im Mausinfektionsmodell haben, wurde in verschiedenen Untersuchungen analysiert. Jedoch wurden in den Studien zumeist mit *Y. pseudotuberculosis* oder *Y. enterocolitica* O:9 Mutanten gearbeitet. Diese Stämme unterscheiden sich in einigen Virulenzfaktoren deutlich von *Y. enterocolitica* O:8.

Das mit dem Darmepithel des Wirtes wechselwirkende Protein Invasin vermittelt in der Zellkultur bei *Y. pseudotuberculosis* die Aufnahme wesentlich effizienter als bei *Y. enterocolitica* (Dersch *et al.* 2000). YadA, ein essentieller Pathogenitätsfaktor von *Y. enterocolitica*, besitzt trotz einer vergleichbaren Adhäsionsleistung an eukaryotischen Zellen zum YadA von *Y. pseudotuberculosis* nur eine äußerst geringe Invasionsfähigkeit (Heesemann *et al.* 1987). YadA bindet an eine extrazelluläre Matrix wie Kollagen (Emody *et al.* 1989) und trägt zur Serumresistenz bei *Y. enterocolitica* bei (Pilz *et al.* 1992). So wiesen Untersuchungen zum Virulenzverhalten von *yop* Mutanten in *Y. pseudotuberculosis* teilweise deutliche Unterschiede zu den entsprechenden *yop* Mutanten in *Y. enterocolitica* auf. Aufgrund dessen sind die Ergebnisse der Virulenzstudien nicht zwischen den verschiedenen *Yersinia* Spezies übertragbar. Für *Y. enterocolitica* O:8 gibt es Virulenzdaten für die Mutanten, bei denen ein einziges Yop deletiert worden ist. Diese Untersuchungen zeigten bei oraler Infektion eine starke Attenuierung bei den Stämmen Δ YopM, Δ YopH und Δ YopQ. Sie konnten die Leber und Milz nicht kolonisieren und waren nur in Darm und Peyer Patches nachweisbar. Die Mutanten Δ YopE und Δ YopP waren leicht attenuiert und konnten Leber und Milz kolonisieren, wurden aber im Laufe der Zeit eliminiert. Die Mutanten Δ YopT und Δ YopO entsprachen in etwa dem des Wildtyps WA-C(pYV::CM) und führten zwischen Tag 7 und 12 nach Infektion aufgrund einer systemischen Infektion und hohen Keimzahlen in den Organen zum Tod (Trülzsch *et al.* 2004).

In dieser Arbeit wurden Doppelmutanten auf Basis der vorher angesprochenen Δ YopP Mutante hergestellt und im Mausinfektionsmodell untersucht. Ferner beinhalteten alle Stämme das Plasmid pHR430, was zum einen eine weitere Attenuierung zur Folge hat, aber gleichzeitig die Vergleichbarkeit mit allen anderen Experimenten dieser Arbeit zulässt. Der Yop-lose Stamm WA-C(pTTSS) zeigte die stärkste Attenuierung. Im oralen Infektionsmodell konnten 5 Tage nach Infektion keine Yersinien aus Dünndarm, Peyer'sche Plaques, Milz noch Leber reisoliert werden (s. Abbildung 13).

Im i.v. Infektionsmodell ist dies sehr ähnlich. Hier führte erst eine Erhöhung der Dosis um das hundertfache zu einer längeren Besiedelung von Milz und Leber (s. Abbildung 14). Trotz der hohen Keimzahl konnte der WA-C(pTTSS) 8 Tage nach Infektion nicht mehr nachgewiesen werden. Diese schnelle Eliminierung unterstreicht die große Bedeutung der Yops als Virulenzfaktoren, die das Überleben der Bakterien im Wirt sichern sollen.

Die Δ PH Mutante zeigte eine starke Attenuierung sowohl bei oraler als auch i.v. Gabe. Nach oraler Gabe konnte dieser Stamm nur vereinzelt im Dünndarm nachgewiesen werden, eine Besiedelung der Peyer'schen Plaques konnte nicht beobachtet werden. Nach i.v. Infektion nahm die Keimzahl in der Milz und Leber stark ab. Dies ist eine ähnliche Beobachtung wie bei der Δ YopH Mutante und deutet auf eine wichtige Effektorfunktion hin. Auch in *Y. pseudotuberculosis* konnte durch Deletion des YopH eine verringerte Virulenz festgestellt werden (Logsdon *et al.* 2003).

Die Besiedelung der Stämme Δ PE und Δ PQ beschränkte sich nach oraler Infektion auf den Dünndarm sowie die Peyer'schen Plaques. Sporadisch konnten sie auch in Milz und Leber nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen der Δ YopQ Mutante in *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* (Holmstrom *et al.* 1995). Die Δ PE Mutante verhält sich nach oraler Infektion nochmals attenuierter als die Δ E Mutante, die an Tag 5 in Leber und Milz gut nachweisbar war. Bei beiden Stämmen (Δ E und Δ Q) zeigt sich eine weitere Attenuierung durch Deletion des *yopP* Gens (Δ PE und Δ PQ). Diese resultiert, wie erwartet, in einer geringeren Keimzahl in den verschiedenen Organen. Auch bei einer i.v. Infektion zeigte sich, daß Δ PE und Δ PQ sich ähnlich verhalten und die Keimzahl in Leber und Milz stark abnahm.

Δ PM konnte wie die Δ M Mutante nach oraler Infektion nur im Dünndarm sowie den Peyer'schen Plaques nachgewiesen werden, jedoch mit niedrigerer Keimzahl. Bei i.v. Infektionen zeigt sich zu Δ PE und Δ PQ kaum ein Unterschied.

Δ YopO Mutanten zeigten in *Y. pseudotuberculosis* sowie in *Y. enterocolitica* ein dem Wildtyp ähnliches Virulenzverhalten (Logsdon *et al.* 2003) sowohl bei oraler als auch i.v. Infektion. Die Δ PO Mutante zeigt eine leichte aber signifikante Attenuierung gegenüber der Δ YopP Mutante. Der Einfluss des YopO auf die Virulenz ist folglich geringer als der des YopE.

Die Mutanten Δ PT und Δ PLcrV_{K42Q} zeigen in beiden Infektionsmodellen keinerlei signifikante Unterschiede zur Δ YopP Mutante. Die Punktmutation im LcrV sollte durch den Verlust der Eigenschaft IL-10 zu induzieren, einen Effekt erzielen. Die erzielten Ergebnisse legen nahe, daß diese Effekte sehr gering sind, wenn überhaupt vorhanden, da statistisch kein Unterschied festgestellt werden konnte. Dies deckt sich mit den von der Gruppe von R. Isberg publizierten Ergebnissen. Sie zeigten, daß die IL-10 Induktion unabhängig von LcrV und TLR2 ist (Auerbuch *et al.* 2007).

Obwohl für YopT wie auch für YopO eine starke Hemmung der Phagozytose in der Zellkultur nachgewiesen werden konnte (Grosdent *et al.* 2002), besitzt YopT in diesem Modell einen sehr geringen Einfluss auf die Virulenz. Die Δ YopT Mutante zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp sogar als etwas virulenter, was in einer leicht erhöhten Keimzahl in Leber und Milz zum Ausdruck kam (Trülzsch *et al.* 2004). YopE, YopO und YopT wirken allesamt auf das Zytoskelett, aber interagieren in unterschiedlicher Weise mit den GTPasen Rho, Rac und Cdc42 (A.3.2.4). Es ist denkbar, daß diese drei Yops, zumindest sich teilweise, überschneidende Effekte besitzen und daraus, trotz Deletion eines einzelnen Yops, eine teilweise Komplementierung des fehlenden Yop-Effektes resultiert.

Insgesamt gesehen zeigte sich, daß YopH, YopE, YopQ und YopM neben YopP einen großen Einfluss auf die Virulenz, das Etablieren einer Infektion und das Überleben im Wirtsorganismus haben. Dagegen sind die Auswirkungen eines Fehlens von YopT bzw. YopO von nicht so gravierendem Ausmaß für die Virulenz.

D.2 Untersuchung der Immunantwort auf ein heterologes Antigen

Neben der Untersuchung der Virulenz der verschiedenen Deletionsmutanten wurde in dieser Arbeit die Eignung dieser Mutanten als Impfstoffträger untersucht. Als Impfstoff wurde ein Fusionsprotein bestehend aus YopE und dem Listeriolysin O (LLO) verwendet, welches von *Y. enterocolitica* in das Zytosol der Wirtszelle transloziert wird. Die dadurch induzierte zelluläre Immunantwort auf das Modellantigen LLO aus *L. monocytogenes* wurde näher untersucht. Durch die Immunisierung mit einem auf *Y. enterocolitica* basierendem Impfstamm konnte eine protektive Immunität gegen eine *Listeria* Wildtyp Infektion hervorgerufen werden.

D.2.1 Lebendvektoren induzieren zelluläre Immunantwort *in vivo*

Das in dieser Arbeit verwendete YopE Fusionsprotein YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45, welches sich auf dem Plasmid pHR430 befindet, verfügt über die zwei immundominanten Epitope: LLO₉₁₋₉₉ und LLO₁₉₀₋₂₀₁. Dadurch wurde die Untersuchung der CD4⁺ und der CD8⁺ T-Zellantwort im oralen Mausinfektionsmodell möglich. Der Vergleich der T-Zellantwort auf LLO nach oraler bzw. i.v. Infektion mit den verschiedenen YopP Doppelmutanten sollte zum Einen einen möglichen Effekt der Yop Proteine auf die Immunantwort des Wirtsorganismus offenlegen. Zum Anderen war das Ziel die Verminderung der Virulenz unter gleichzeitigem Erhalt der Immunogenität des Erregers, wodurch die Nebenwirkungen einer Impfung im Allgemeinen reduziert werden.

Es konnte festgestellt werden, daß mit einer erhöhten Attenuierung der Bakterien, die Induktion einer Immunantwort verschlechtert wurde. So lösten die am stärksten attenuierten Stämme ΔPH, ΔPE, ΔPQ und ΔPM sowohl eine schwache LLO₁₉₀₋₂₀₁ spezifische CD4⁺, als auch eine schwache LLO₉₁₋₉₉ spezifische CD8⁺ T-Zellantwort aus. Dies gilt für beide Infektionsarten gleichermaßen (s. C.1.6.1 und C.1.6.2C.1.4.2).

Nach Infektion mit dem *yop*-losen Stamm WA-C(pTTSS) konnte aufgrund der schnellen Eliminierung keine T-Zellantwort nach oraler Infektion detektiert werden. Erst eine 100-fach höhere Dosis, in Bezug auf die anderen Stämme, führte im i.v.-Infektionsmodell zu einer schwachen, den vier stark attenuierten Stämmen ähnlichen, Anzahl von LLO₉₁₋₉₉ spezifischen T-Zellen.

Die Stämme Δ PT, Δ PO und Δ PLcrV_{K42Q} zeigten eine vergleichbare zelluläre Immunantwort wie der Δ YopP Stamm.

Ein entscheidender Faktor für die Induktion einer effektiven Immunantwort ist der Grad der Kolonisierung des Lebendimpfstammes im Wirtsorganismus (Igwe *et al.* 1999). Ein Grund für die schlechte zelluläre Immunantwort bei den Stämmen Δ PH, Δ PE, Δ PQ und Δ PM könnte die schlechtere Kolonisierung sein. Sie kolonisieren den Dünndarm und die Peyer'schen Plaques, sind aber kaum in der Lage Milz und Leber zu besiedeln. Dies trat nur sporadisch auf (s. C.1.4.1). Auch nach i.v.-Infektion zeigten diese Stämme eine schlechtere Kolonisierung gegenüber dem Δ YopP Stamm, mit Ausnahme des Δ PM Stammes. Aufgrund der starken Attenuierung und der damit einhergehenden schnellen Eliminierung der Bakterien kommt es zu keiner oder nur sehr kurzen Kolonisierung des Wirtsorganismus.

Der Stamm Δ PM zeigt nach i.v. Infektion eine deutlich verbesserte zelluläre Immunantwort als nach oraler Immunisierung und ist tendenziell, aber nicht signifikant, besser als die des Δ YopP Stammes. Dies ist ein Hinweis darauf, dass YopM Einfluß auf die Suppression der Immunantwort hat. In *Y. pestis* konnte für YopM gezeigt werden, daß dieses Yop in der frühen Phase einer Infektion eine Rolle spielt und ein essentieller Virulenzfaktor bei der Infektion von Mäusen (Leung *et al.* 1990; Kerschen *et al.* 2004).

Die Stämme Δ PT, Δ PO und Δ PLcrV_{K42Q} zeigen nach oraler Infektion, bezogen auf den Δ YopP Stamm, ein geringeres Potential LLO₉₁₋₉₉ spezifische CD8⁺ T-Zellen zu induzieren. Grund dafür könnte die weniger effiziente Kolonisierung der Peyer'schen Plaques sowie der Milz (im Falle der Δ PO Mutante) sein. Unterstützt wird dies durch die i.v.-Infektion. Dort zeigte sich bei den Stämmen Δ PT, Δ PO, Δ PLcrV_{K42Q} und Δ YopP eine vergleichbare Kolonisierung der Organe und kein signifikanter Unterschied in der Anzahl induzierter LLO₉₁₋₉₉ spezifischen CD8 T-Zellen (s. C.1.4.1 und C.1.6.1). In Bezug auf die CD4⁺ T-Zellantwort war zwischen den Stämmen Δ PT, Δ PO, Δ PLcrV_{K42Q} und Δ YopP kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Sowohl für *Y. pseudotuberculosis* als auch *Y. enterocolitica*, die aufgrund des Plasmides pHR430 das YopE-LLO-Fusionsprotein translokieren, konnte die Induktion einer spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort auf LLO im Mausinfektionsmodell nachgewiesen werden (Rüssmann *et al.* 2003).

Interessant ist die Induktion spezifischer CD4⁺ T-Zellen nach Translokation. Üblicherweise werden intrazelluläre Proteine auf den MHC-I Weg prozessiert, was zu einem CD8⁺ T-Zellpriming führt (Rüssmann *et al.* 2003). In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß einige MHC-II prozessierte Proteine aus dem Zytosol stammten (Rudensky *et al.* 1991; Lechler *et al.* 1996). Eine weitere Erklärung ist möglicherweise die „Cross Presentation“ (Kreuzpräsentation). Dies ist ein anderer Weg der Antigenpräsentation bei dem apoptotische oder nekrotische Zellen durch Makrophagen oder DCs

phagozytiert werden. Die endosomale Prozessierung der phagozytierten Peptide, darunter auch translozierte Antigene, und die anschließende Präsentation im MHC-Klasse-II Kontext führt folglich zu einer CD4⁺ T-Zellantwort.

Aufgrund der starken Attenuierung und der schlechten Kolonisierung konnten keine Effekte von Yops auf das Priming von T-Zellen erfasst werden. Z.B. konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, daß YopH in vitro die B- und T-Zell-Aktivierung inhibiert (Yao *et al.* 1999; Alonso *et al.* 2004), während im Mausmodell eine Kolonisierung mit Δ H-Mutanten nach oraler oder i.v.-Gabe zu einer raschen Eliminierung und schwachen zellulären Immunantwort führt.

D.2.2 Durch Lebendvektoren vermittelter Schutz vor *Listeria* Wildtyp Infektion

Basierend auf der Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort gegen das heterologe Antigen YopE-LLO führten ähnliche Versuche mit *Salmonella*, welche das YopE-LLO Fusionsprotein translozierten, zu einer lang anhaltenden protektiven Immunität gegen Listeriose (Rüssmann *et al.* 2001).

Erst die Inaktivierung von *yopP* ermöglichte die Induktion von spezifischen CD8⁺ T-Zellen und somit die Verwendung von *Y. enterocolitica* als Impfstamm gegen eine *L. monocytogenes* Wildtyp Infektion (Trülzsch *et al.* 2005). Die YopE-LLO-Fusionsprotein translozierenden Stämme wurden einmalig oral verabreicht. 4 Wochen später erfolgte eine i.v. Infektion mit *L. monocytogenes*. 3 Tage nach der Infektion mit *Listeria* wurde die Milz entnommen und die Keimzahl bestimmt. Die Translokation des heterologen Antigens YopE₁₋₁₃₈LLO₅₁₋₃₆₃M45 in das Zytosol der Wirtszelle initiierte eine *Listeria* Wildtyp Infektion und führte abhängig vom verwendeten *Yersinia* Stamm zu einer unterschiedlich starken Bildung von spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (s. C.1.6).

Die Immunisierung mit dem Stamm Δ YopP führte, wie bei einer subletalen Infektion mit *L. monocytogenes*, zu einer vollständigen Elimination der Listerien aus der Milz (s. C.1.7). Die Immunisierung mit den YopE-LLO translozierenden *Yersinia* Stämmen Δ P_T, Δ P_O und Δ P_{LcrV}_{K42Q} führte zu einer stark reduzierten Keimbelastung in der Milz. Möglicherweise hängt dies mit der verringerten Effizienz der Kolonisierung im Vergleich zur Δ YopP Mutante zusammen. Die restlichen Stämme Δ P_H, Δ P_E, Δ P_Q und Δ P_M waren schlechter in der Lage, den Wirtsorganismus zu kolonisieren und eine entsprechende zelluläre Immunantwort zu induzieren. Darin dürfte, neben der raschen Eliminierung der Yersinien, ein Grund für den schlechten Immunschutz zu finden sein.

Neben den CD4⁺ sind CD8⁺ T-Zellen für den Erfolg bei der Etablierung der Immunität wichtig. CD8⁺ T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von intrazellulären Mikroorganismen wie *Listeria*. So können CD8⁺ T-Zellen den Verlauf der Infektion limitieren, indem sie infizierte Zellen erkennen und eliminieren (Amara *et al.* 2005). CD4⁺ T-Zellen helfen bei der Aufrechterhaltung von

CD8⁺ T-Zellen (Sun *et al.* 2003). Somit kann die schwach induzierte CD4⁺ T-Zellantwort durch die Stämme ΔPH, ΔPE, ΔPQ und ΔPM mit ein Grund für die hohe Keimbelastung und den schlechten Immunschutz sein.

Auch mit *Y. pseudotuberculosis* wurde versucht, einen Schutz gegen eine *Listeria* Wildtyp Infektion zu vermitteln. Nach Translokation von YopE-LLO kam es zur Bildung CD4⁺ und CD8⁺ spezifischer T-Zellen, jedoch vermittelte die induzierte Immunantwort nur einen partiellen Schutz. Es wird vermutet, daß die Kreuzpräsentation auch für die Auslösung der CD4⁺ T-Zellantwort auf LLO nach einer *Listeria* Wildtyp Infektion verantwortlich ist (Skoberne *et al.* 2002).

Die Ergebnisse zeigen das Potential von *Y. enterocolitica* heterologe Antigene in das Zytosol von eukaryotischen Zellen zu translozieren und eine protektive Immunität gegen einen intrazellulären Erreger hervorzurufen. Ferner zeigen diese Versuche, daß der Einsatz von *Yersinia* als Lebendimpfstoff sehr stark von der Balance zwischen Virulenz und Immunogenität des Stammes abhängt. Viele der in dieser Arbeit getesteten Stämme waren im Mausmodell zu stark attenuiert oder noch zu virulent um sie als Lebendimpfstoff einsetzen zu können.

D.3 Untersuchung der LcrV-LLO-Fusionsproteine als Totimpfstoff

D.3.1 Herstellung der Proteinimpfstoffe

Neben den herkömmlichen Verfahren zur Impfstoffherstellung, wie z.B. Attenuierung des Erregers, ermöglichen die Entwicklungen in der Molekularbiologie die Konstruktion rekombinanter Antigene. Um die rekombinanten Proteine herzustellen, wurde ein prokaryotisches Expressionssystem genutzt, da die ursprünglichen Komponenten des Proteinimpfstoffes aus Bakterien stammen und somit nicht auf Glykosylierung geachtet werden musste.

Der Totimpfstoff besteht aus zwei Komponenten: Zum einen aus dem LcrV Protein, welches TLR2-Aktivität besitzt und zudem die eigene Aufnahme in das Zytosol der Wirtszelle induziert (Sing 2005). Dabei wurde das Wildtyp-LcrV als auch das K42Q mutierte LcrV N-terminal vor das Antigen kloniert. Das Antigen, der C-terminale Teil des Proteins, ist ein LLO₇₅₋₃₀₆-Fragment mit den immundominanten Epitopen.

Es gelang über mehrere Klonierungsschritte diese rekombinanten Proteine in einem LPS-mutiertem *E. coli* Stamm (B121 ΔmsbB) zu exprimieren. Dieser Stamm enthält zusätzlich einen Vektor, der tRNA Gene mit seltenen Codons kodiert (Kane 1995). Erste Expressionsstudien ergaben, daß die Proteine nach Zelllyse vorrangig im unlöslichen Sediment zu finden waren. Dies sprach für eine Aggregation

der neu synthetisierten Proteine. Die exprimierten Proteine liegen in den so genannten Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) in einem partiell gefalteten Zustand vor. Um die Proteine in Lösung zu bekommen, müssten die Einschlusskörperchen denaturiert und nach der Aufreinigung renaturiert werden (Marston *et al.* 1990). Da hierbei die korrekte Rückfaltung nicht gewährleistet ist, wurde die Proteinexpression in einer Reihe von weiteren Experimenten optimiert. Dadurch konnte die Bildung von Einschlusskörperchen reduziert werden und somit ein höherer Anteil an löslichem Protein in nativer Konformation erhalten werden. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über den Hexa-Histidin-Tag. Dieser befand sich C-terminal um die Bindung des LcrVs an TLR2 nicht zu beeinträchtigen. Dieses oft angewandte Chromatographieverfahren beruht auf der Interaktion eines auf einer Matrix immobilisierten Metallions mit den Seitenketten spezifischer Aminosäuren. In dieser Arbeit wurde anstatt mit dem häufig verwendeten Nickelion (Ni^{2+}) das Cobaltion (Co^{2+}) verwendet. Dieses Chromatographieverfahren konnte erfolgreich zur Aufreinigung von Proteinen aus Bakterien angewandt werden (Chen *et al.* 1994), aber auch aus eukaryotischen Expressionssystemen wie in Hefe oder Säugerzellen (Janknecht *et al.* 1991; Borsig *et al.* 1997). Um die Reinheit der Proteine nach Aufreinigung mittels Hexa-Histidin-Tag zu erhöhen, wurden die Proteine einer Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration) unterzogen. Die Gelfiltration ist eine Säulenchromatographie, bei der die Partikel der Säulenmatrix Poren eines definierten Durchmessers haben. Je nach Größe des Moleküls können diese in die Poren eindringen oder nicht. Dadurch ergibt sich ein Zeitunterschied beim Durchlauf der Säule, der genutzt wird, um nur die in einem entsprechenden Zeitfenster liegenden Proteine aufzufangen. Nach der Gelfiltration wurden die Proteine mittels Spin-Filter aufkonzentriert um die durch die Gelfiltration erwirkte Verdünnung rückgängig zu machen. Die Expression der Proteine in *E. coli* machte eine Abreicherung des bakteriellen Lipopolysaccharids (LPS) nötig. Diese wurde mit dem EndoTrap[®] red-Kit (Profos, Regensburg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Werte bis zu 0.5 pg/ μg gelten als Endotoxin-frei, während Proben bis 5 pg/ μg als leicht Endotoxin kontaminiert bezeichnet werden. Somit wurden auch leicht kontaminierte Proteine für Impfzwecke verwendet. Jedoch wurden diese mit dem BI21 ΔmsbB Stamm exprimiert, dessen LPS eine, bis zu 10.000 fache, stark reduzierte Stimulanzwirkung besitzt (Somerville *et al.* 1996).

D.3.2 Induktion einer spezifischen Immunantwort durch Proteinimmunisierung

In einem ersten Schritt wurde die Applikationsart der Proteinimmunisierung evaluiert. In bisherigen Studien zeigte sich, daß neben dem Antigen auch die Art des verwendeten Adjuvans, die Dosis und die Applikationsart eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Immunantwort spielen (Comoy *et al.* 1998; Leclerc *et al.* 1998). So wurden als erstes die Proteine i.p. und s.c. gespritzt und die zelluläre Immunantwort bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die i.p. Applikation besser geeignet scheint, da hier mehr spezifische CD8^+ T-Zellen generiert wurden (s. C.2.3.1). Um die Anzahl dieser spezifischen T-Zellen zu steigern wurde die Dosis verfünffacht. Zudem wurden die Proteine durch Zugabe von

inkompletten Freundschens Adjuvans (IFA) stabilisiert. Durch das Einbinden des Antigens bzw. Proteins entsteht ein Depot, welches nur langsam aufgelöst wird. Dadurch kann die Halbwertszeit des Antigens im Körper um ein Vielfaches verlängert und die Immunantwort durch den verlängerten Kontakt verstärkt werden. Mit dem Einsatz von Adjuvantien ist es zudem möglich, die Immunantwort zu beeinflussen und in eine bestimmte T_H -Richtung zu verschieben. So werden in der Medizin Totimpfstoffe und Toxoide mit Adjuvantien versetzt, um die Antikörpertiter zu erhöhen (Tizard 1981). Das IFA wurde gewählt, da es kaum immunmodulatorisch wirksam ist, dafür aber gute Kurzzeitdepots bildet (Cox *et al.* 1997). IFA stimuliert die humorale Immunantwort, ohne die zelluläre Immunantwort zu beeinflussen (Jensen *et al.* 1998).

Mit diesem Versuchsaufbau konnte eine LLO spezifische T-Zellantwort induziert werden (s. C.2.3.2 und C.2.3.3). Dabei lieferten der ELISpot-Assay vergleichbare Ergebnisse wie die FACS-Analyse. Nur im ELISpot-Assay wurde die $CD4^+$ -Antwort bestimmt (s. Abbildung 23).

Es zeigte sich, daß durch die Proteinimpfung auch eine zwischen den verschiedenen Proteinen vergleichbare $CD4^+$ -Antwort induziert wurde. FACS und ELISpot-Assay zeigen, daß ein signifikanter Unterschied bei der $CD8^+$ T-Zellantwort auf das Fusionsprotein und dem LLO-Kontrollprotein besteht. Da zwischen dem LcrV-LLO Fusionsprotein und dem Proteinmix aus einem Molekül LcrV und einem Molekül LLO kein Unterschied besteht, kann eine Translokatoreigenschaft des LcrVs im Mausmodell nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse weisen eher auf eine Adjuvanswirkung des LcrVs hin. Ein Grund dafür könnte sein, daß trotz IFA das Protein schnell degradiert wird und somit das LLO₇₅₋₃₀₆ nicht mit dem LcrV ins Zytosol gelangt. Die TLR2-Domäne des LcrV wäre aber noch aktiv und könnte über TLR2 und MyD88 den Transkriptionsfaktor NF- κ B induzieren (Takeda *et al.* 2004; Sing 2005). Unterstützt wird die Schlussfolgerung der Adjuvanswirkung von anderen Arbeiten, bei denen PAMP-Antigen-Fusionsproteine zur Immunisierung benutzt wurden. Es konnte gezeigt werden, daß diese PAMP-Antigen-Fusionsproteine ohne Zusatz von Adjuvantien eine schnelle und starke Antigen-spezifische Immunantwort hervorrufen (Huleatt *et al.* 2007).

D.3.3 Schutz vor *Listeria* Wildtyp Infektion nach Proteinimmunisierung

Daß je nach Infektionsart T_{CM} oder T_{EM} Schutz vermitteln, wurde von der Gruppe um A. Oxenius gezeigt. So ist, bei sich schnell vermehrenden peripheren viralen Infektionen, die Anwesenheit einer ausreichend hohen Anzahl von antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen der T_E - und T_{EM} -Population für die erfolgreiche Eliminierung der Viren ausschlaggebend (Cerwenka *et al.* 1999; Hogan *et al.* 2001; Bachmann *et al.* 2005). Bei einer systemischen Infektion hingegen, wird der Schutz durch die T_{CM} -Population gebildet (Wherry *et al.* 2003; Zaph *et al.* 2004). Jedoch sind diese Ergebnisse nicht auf eine systemische *Listeria*-Infektion übertragbar. Hier scheint die schützende T-Zell-Population die T_{EM} -Population zu sein. Dies wird durch Experimente belegt, bei denen die Immunantwort einer

Infektion mit durch Hitze abgetöteten (*heat-killed*) *L. monocytogenes* mit einer *Listeria* Wildtyp-Infektion verglichen wurde. Es konnte nachgewiesen werden, daß in beiden Fällen eine antigenspezifische CD8⁺ T-Zellantwort induziert werden konnte, die in der absoluten Zellzahl vergleichbar war. Diese antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen waren in der Lage IFN γ zu sekretieren und wiesen nach einer Belastungsinfektion eine starke Expansion auf. Trotzdem konnte durch die Immunisierung mit *heat-killed L. monocytogenes* kein Schutz vor einer *Listeria* Wildtyp-Infektion erzielt werden. Im Gegensatz zur Infektion mit lebenden Listerien, konnte bei den abgetöteten Listerien keine CD8 Effektor T-Zellen nachgewiesen werden (Lauvau *et al.* 2001; Huster *et al.* 2006).

Dies führte zu der Frage, ob die Proteinimmunisierung eine ausreichende Anzahl von T-Zellen der unterschiedlichen Subpopulationen generiert, um vor einer letalen *Listeria*-Infektion schützen zu können. Nach der Immunisierung mit den verschiedenen Proteinen kam es zu einer Generierung von spezifischen CD8⁺ T-Zellen aller drei Subpopulationen. Die Belastungsinfektion zeigte, daß die Immunisierung mit den verschiedenen Proteinen zu einem leichten Schutz in Bezug auf naive Mäuse führte. Zwischen den Proteingruppen konnte aber kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies legt den Schluss nahe, daß die Anzahl der generierten T_{EM} Population noch zu niedrig ist, um einen effektiven Schutz zu vermitteln.

E ZUSAMMENFASSUNG

Essentiell für die Pathogenität von *Y. enterocolitica* O:8 ist das Vorhandensein des 70 kb großen Virulenzplasmides (pYV), auf dem die Gene eines Typ-III-Sekretionssystems kodiert sind. Dieses wird benötigt, um 6 Effektorproteine (YopP, YopE, YopT, YopH, YopO und YopM) in die Wirtszelle zu translozieren, wo sie mit verschiedenen Zellstrukturen und Signaltransduktionskaskaden interagieren, um der angeborenen Immunantwort zu entgehen. Durch gezielte Deletionen von *yop*-Genen und der anschließenden Untersuchung der *yop* Deletionsmutanten konnte deren Einfluss auf die Virulenz, der Antigenpräsentation und der Immunantwort des Wirtsorganismus nachgewiesen werden. Durch die Translokation eines heterologen Antigens wurde eine spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort gegen den Virulenzfaktor Listeriolysin O (LLO) aus *Listeria monocytogenes* erzielt. Es wurden folgende genetisch stabile *yop* Deletionsmutanten erzeugt: Δ PE, Δ PH, Δ PQ, Δ PM, Δ PO, Δ PT und Δ P_{LcrV}_{K42Q}. Die Virulenz dieser Mutanten wurde im Vergleich zum Wildtyp [WA-C(pYV::CM)] und Δ YopP im oralen sowie i.v. Mausinfektionsmodell untersucht.

Von allen getesteten Mutanten erwies sich die Δ YopP-Mutante als der am besten geeignete Impfstamm. Die YopE-LLO-M45 translozierende Δ YopP-Mutante konnte die höchste Anzahl von CD8⁺ T-Zellen in vivo nach oraler Applikation induzieren. Ferner konnte durch eine einmalige orale Immunisierung mit dieser Mutante ein Schutz gegen eine *Listeria* Wildtyp Infektion vermittelt werden. Leider ist die Δ YopP-Mutante, aufgrund einer ca. 10%igen Sterblichkeitsrate bei Mäusen, als Lebendvektor ungeeignet.

Sowohl die Mutanten Δ PT als auch Δ P_{LcrV}_{K42Q} zeigten bei der Kolonisierung keinen wesentlichen Unterschied zur Δ YopP-Mutante. Somit konnte gezeigt werden, daß YopT und die Punktmutation K42Q im LcrV keine bedeutende Auswirkung auf die Virulenz besitzen. Jedoch führte die Deletion von *yopT*, *yopO* oder der Punktmutation im LcrV in der Δ YopP-Mutante zu einer signifikant niedrigeren Anzahl von LLO₉₁₋₉₉ spezifischen CD8⁺ T-Zellen. So konnte durch eine einmalige orale Immunisierung konnte mit den *Y. enterocolitica* Stämmen Δ P_{LcrV}_{K42Q}, Δ PT und Δ PO nur ein partieller Schutz erzielt werden.

Die Deletion von *yopE*, *yopH*, *yopQ*, *yopO* oder *yopM* führte zu einer signifikanten Einschränkung der Virulenz im Mausmodell. Die Effektorproteine YopH, YopQ, YopE und YopM erwiesen sich als essentiell für die Etablierung einer Infektion. Durch Deletion der entsprechenden Gene konnten diese Mutanten, nach oraler Infektion, nur in geringer Zahl z.B. in den Peyer'schen Plaques nachgewiesen werden. Auch nach i.v. Infektion wurde eine deutliche Reduktion der Keimzahlbelastung in der Maus festgestellt. Die Stämme Δ PE, Δ PH, Δ PM, Δ PQ und der Yop-lose Stamm WA-C(pTTSS) konnten nach oraler Infektion nur wenige CD8⁺ spezifischen T-Zellen induzieren und vermittelten keinen Schutz gegen eine *Listeria* Wildtyp Infektion.

Alle Stämme translozierten ein heterologes Antigen, welches es ermöglichte, neben der Induktion einer zellulären Immunantwort den Einfluß auf die Antigenpräsentation von DCs zu untersuchen. Es

zeigte sich, daß die Deletion von Yops auch Auswirkungen auf die Antigenpräsentation *in vitro* hat. Die beste Antigenpräsentation konnte nach Infektion mit dem Yop-losen Stamm WA-C(pTTSS) gemessen werden. Die Δ YopP-Mutante und alle deren Abkömmlinge inhibieren signifikant besser die Antigenpräsentation durch DCs. Die stärkste Inhibition der Antigenpräsentation konnte in den Yop-Einzelmutanten (ausser Δ YopP) sowie dem *Yersinia*-Wildtyp gemessern werden.

So verdeutlicht diese Arbeit das Potential von *Y. enterocolitica* durch Translokation eines heterologen Antigens, eine protektive Immunität gegen einen intrazellulären Erreger zu vermitteln.

Das LcrV Protein aus *Y. enterocolitica* hat laut Literatur die Eigenschaft, an TLR2-positive Zellen zu binden, dann mittels Makropinozytose aufgenommen zu werden und in das Zytosol der eukaryotischen Zelle zu gelangen. Diese Eigenschaft sollte ausgenutzt werden um einen Totimpfstoff zu generieren, der aus 2 Teilen besteht:

1. dem LcrV als Translokator und
2. dem Antigen gegen einen intrazellulären Erreger (*Listeria monocytogenes*)

Durch Fusionierung der beiden Proteine sollte es möglich sein, das Antigen mit in das Zytosol der TLR2-positiven Zelle zu schleusen.

So wurden verschiedene Proteine exprimiert, gereinigt und im Mausmodell getestet. Dabei wurden die Immunantwort und ein sich daraus ergebender Schutz untersucht.

Nach i.p. Applikation der Proteine konnte mittels FACS und ELISpot-Assay eine CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort festgestellt werden. Das Fusionsprotein LcrV-LLO generierte dabei eine signifikant höhere CD8⁺ T-Zellantwort als das Kontrollprotein LLO. Die Proteine konnten insgesamt für eine leichte Reduzierung der Keimzahl nach einer Belastungsinfektion sorgen, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Immunisierung mit dem LcrV-Fusionsprotein und dem Kontrollprotein.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A. K. and A. H. Lichtman (2003). Cellular and Molecular Immunology W.B. Saunders Company.
- Adkins, I., M. Koberle, et al. (2008). "Y. enterocolitica inhibits antigen degradation in dendritic cells." Microbes Infect **10**(7): 798-806.
- Aepfelbacher, M. (2004). "Modulation of Rho GTPases by type III secretion system translocated effectors of Yersinia." Rev Physiol Biochem Pharmacol **152**: 65-77.
- Aepfelbacher, M., C. Trasak, et al. (2007). "Effector functions of pathogenic Yersinia species." Thromb Haemost **98**(3): 521-9.
- Agarwal, S. and A. Rao (1998). "Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation." Immunity **9**(6): 765-75.
- Ahmed, R. and D. Gray (1996). "Immunological memory and protective immunity: understanding their relation." Science **272**(5258): 54-60.
- Alonso, A., N. Bottini, et al. (2004). "Lck dephosphorylation at Tyr-394 and inhibition of T cell antigen receptor signaling by Yersinia phosphatase YopH." J Biol Chem **279**(6): 4922-8.
- Amara, R. R., C. Ibegbu, et al. (2005). "Studies using a viral challenge and CD8 T cell depletions on the roles of cellular and humoral immunity in the control of an SHIV-89.6P challenge in DNA/MVA-vaccinated macaques." Virology **343**(2): 246-55.
- Anderson, D. M. and O. Schneewind (1999). "Yersinia enterocolitica type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ." Mol Microbiol **31**(4): 1139-48.
- Andor, A., K. Trulzsch, et al. (2001). "YopE of Yersinia, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells." Cell Microbiol **3**(5): 301-10.
- Anisimov, A. P., L. E. Lindler, et al. (2004). "Intraspecific diversity of Yersinia pestis." Clin Microbiol Rev **17**(2): 434-64.
- Auerbuch, V. and R. R. Isberg (2007). "Growth of Yersinia pseudotuberculosis in mice occurs independently of Toll-like receptor 2 expression and induction of interleukin-10." Infect Immun **75**(7): 3561-70.
- Autenrieth, I. B., M. Beer, et al. (1994). "Immune responses to Yersinia enterocolitica in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon." Infect Immun **62**(6): 2590-9.
- Autenrieth, I. B., A. Tingle, et al. (1992). "T lymphocytes mediate protection against Yersinia enterocolitica in mice: characterization of murine T-cell clones specific for Y. enterocolitica." Infect Immun **60**(3): 1140-9.
- Bachmann, M. F., L. Hunziker, et al. (2004). "Maintenance of memory CTL responses by T helper cells and CD40-CD40 ligand: antibodies provide the key." Eur J Immunol **34**(2): 317-26.

- Bachmann, M. F., P. Wolint, et al. (2005). "Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L." J Immunol **175**(7): 4686-96.
- Balligand, G., Y. Laroche, et al. (1985). "Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination." Infect Immun **48**(3): 782-6.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Barnes, P. D., M. A. Bergman, et al. (2006). "*Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine." J Exp Med **203**(6): 1591-601.
- Barz, C., T. N. Abahji, et al. (2000). "The *Yersinia* Ser/Thr protein kinase YpkA/YopO directly interacts with the small GTPases RhoA and Rac-1." FEBS Lett **482**(1-2): 139-43.
- Benabdillah, R., L. J. Mota, et al. (2004). "Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp." Microb Pathog **36**(5): 247-61.
- Black, D. S. and J. B. Bliska (2000). "The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence." Mol Microbiol **37**(3): 515-27.
- Bliska, J. B. and D. S. Black (1995). "Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase." Infect Immun **63**(2): 681-5.
- Bliska, J. B., M. C. Copass, et al. (1993). "The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells." Infect Immun **61**(9): 3914-21.
- Boland, A. and G. R. Cornelis (1998). "Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection." Infect Immun **66**(5): 1878-84.
- Boland, A., M. P. Sory, et al. (1996). "Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus." EMBO J **15**(19): 5191-201.
- Bolin, I. and H. Wolf-Watz (1984). "Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of *Yersinia pseudotuberculosis*." Infect Immun **43**(1): 72-8.
- Borsig, L., E. G. Berger, et al. (1997). "Expression and purification of His-tagged beta-1,4-galactosyltransferase in yeast and in COS cells." Biochem Biophys Res Commun **240**(3): 586-9.
- Bottone, E. J. (1997). "*Yersinia enterocolitica*: the charisma continues." Clin Microbiol Rev **10**(2): 257-76.
- Brenner, D. J. (1979). "Speciation in *Yersinia*." Contrib Microbiol Immunol **5**: 33-43.
- Brunt, L. M., D. A. Portnoy, et al. (1990). "Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8+ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth." J Immunol **145**(11): 3540-6.

- Burrows, T. W. (1956). "An antigen determining virulence in *Pasteurella pestis*." Nature **177**(4505): 426-7.
- Cerwenka, A., T. M. Morgan, et al. (1999). "Naive, effector, and memory CD8 T cells in protection against pulmonary influenza virus infection: homing properties rather than initial frequencies are crucial." J Immunol **163**(10): 5535-43.
- Chang, A. C. and S. N. Cohen (1978). "Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid." J Bacteriol **134**(3): 1141-56.
- Chapman, H. A. (1998). "Endosomal proteolysis and MHC class II function." Curr Opin Immunol **10**(1): 93-102.
- Chen, B. P. and T. Hai (1994). "Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host." Gene **139**(1): 73-5.
- China, B., M. P. Sory, et al. (1993). "Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules." Infect Immun **61**(8): 3129-36.
- Cirillo, D. M., R. H. Valdivia, et al. (1998). "Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival." Mol Microbiol **30**(1): 175-88.
- Comoy, E. E., A. Capron, et al. (1998). "Adjuvant is the major parameter influencing the isotype profiles generated during immunization with a protein antigen, the *Schistosoma mansoni* Sm28-GST." Scand J Immunol **47**(5): 444-52.
- Constantin, C. M., E. E. Bonney, et al. (2002). "Major histocompatibility complex (MHC) tetramer technology: an evaluation." Biol Res Nurs **4**(2): 115-27.
- Cornelis, G. R. (1998). "The *Yersinia* deadly kiss." J Bacteriol **180**(21): 5495-504.
- Cornelis, G. R. (2002). "*Yersinia* type III secretion: send in the effectors." J Cell Biol **158**(3): 401-8.
- Cornelis, G. R. (2002). "The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(10): 742-52.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." Nat Rev Microbiol **4**(11): 811-25.
- Cornelis, G. R., T. Biot, et al. (1989). "The *Yersinia* yop regulon." Mol Microbiol **3**(10): 1455-9.
- Cornelis, G. R. and F. Van Gijsegem (2000). "Assembly and function of type III secretory systems." Annu Rev Microbiol **54**: 735-74.
- Cornelis, G. R. and H. Wolf-Watz (1997). "The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells." Mol Microbiol **23**(5): 861-7.
- Cossart, P. (2002). "Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview." Int J Med Microbiol **291**(6-7): 401-9.
- Cox, J. C. and A. R. Coulter (1997). "Adjuvants--a classification and review of their modes of action." Vaccine **15**(3): 248-56.
- Coyle, A. J. and J. C. Gutierrez-Ramos (2001). "The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function." Nat Immunol **2**(3): 203-9.

- Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-5.
- Dersch, P. and R. R. Isberg (2000). "An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors." Infect Immun **68**(5): 2930-8.
- Dooms, H. and A. K. Abbas (2002). "Life and death in effector T cells." Nat Immunol **3**(9): 797-8.
- Dukuzumuremyi, J. M., R. Rosqvist, et al. (2000). "The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor." J Biol Chem **275**(45): 35281-90.
- Emody, L., J. Heesemann, et al. (1989). "Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms." J Bacteriol **171**(12): 6674-9.
- Erfurth, S. E., S. Grobner, et al. (2004). "*Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells." Infect Immun **72**(12): 7045-54.
- Evdokimov, A. G., D. E. Anderson, et al. (2001). "Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit." J Mol Biol **312**(4): 807-21.
- Everest, P., P. Griffiths, et al. (1995). "Live *Salmonella* vaccines as a route towards oral immunisation." Biologicals **23**(2): 119-24.
- Fallman, M., C. Persson, et al. (1997). "*Yersinia* proteins that target host cell signaling pathways." J Clin Invest **99**(6): 1153-7.
- Fields, K. A., M. L. Nilles, et al. (1999). "Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface." Infect Immun **67**(10): 5395-408.
- Fields, K. A. and S. C. Straley (1999). "LcrV of *Yersinia pestis* enters infected eukaryotic cells by a virulence plasmid-independent mechanism." Infect Immun **67**(9): 4801-13.
- Frederiksen, W. (1964). "A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (*Bacterium enterocoliticum* and *Pasteurella*)." X.Proc.14 th Sand.Congr.Path.Microbiol.: 108.
- Gaede, K., M. Nazet, et al. (1995). "Treatment of arthritis in Lewis rats by a monoclonal antibody against alpha beta T cell receptor: differential sensitivity of *Yersinia*-induced arthritis versus adjuvant arthritis." Clin Immunol Immunopathol **77**(3): 339-48.
- Geginat, G., S. Schenk, et al. (2001). "A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*." J Immunol **166**(3): 1877-84.
- Germain, R. N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." Cell **76**(2): 287-99.
- Goure, J., P. Broz, et al. (2005). "Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes." J Infect Dis **192**(2): 218-25.
- Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, et al. (2002). "Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis." Infect Immun **70**(8): 4165-76.

- Guan, K. L. and J. E. Dixon (1990). "Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*." Science **249**(4968): 553-6.
- Hakansson, S., K. Schesser, et al. (1996). "The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity." EMBO J **15**(21): 5812-23.
- Hamid, N., A. Gustavsson, et al. (1999). "YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages." Microb Pathog **27**(4): 231-42.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Harty, J. T., A. R. Tinnereim, et al. (2000). "CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection." Annu Rev Immunol **18**: 275-308.
- Heesemann, J., K. Gaede, et al. (1993). "Experimental *Yersinia enterocolitica* infection in rodents: a model for human yersiniosis." APMIS **101**(6): 417-29.
- Heesemann, J., U. Gross, et al. (1987). "Genetic manipulation of virulence of *Yersinia enterocolitica*." Contrib Microbiol Immunol **9**: 312-6.
- Heesemann, J., U. Gross, et al. (1986). "Immunochemical analysis of plasmid-encoded proteins released by enteropathogenic *Yersinia* sp. grown in calcium-deficient media." Infect Immun **54**(2): 561-7.
- Heesemann, J., C. Keller, et al. (1983). "Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis." J Infect Dis **147**(1): 107-15.
- Heesemann, J. and R. Laufs (1983). "Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid." J Bacteriol **155**(2): 761-7.
- Heesemann, J. E. b. H. B., H. J. Eggers, W. Köhler & G. Pulverer. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag. (1994). Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen. In: Brandis, H., Eggers, H.J., Köhler, W., Pulverer, G.(Hrsg.), Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York, S. 313- 317.
- Hill, J., S. E. Leary, et al. (1997). "Regions of *Yersinia pestis* V antigen that contribute to protection against plague identified by passive and active immunization." Infect Immun **65**(11): 4476-82.
- Hogan, R. J., E. J. Usherwood, et al. (2001). "Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections." J Immunol **166**(3): 1813-22.
- Hoiczky, E. and G. Blobel (2001). "Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4669-74.
- Holmstrom, A., J. Olsson, et al. (2001). "LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*." Mol Microbiol **39**(3): 620-32.
- Holmstrom, A., J. Petterson, et al. (1997). "YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane." Mol Microbiol **24**(1): 73-91.
- Holmstrom, A., R. Rosqvist, et al. (1995). "Virulence plasmid-encoded YopK is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* to cause systemic infection in mice." Infect Immun **63**(6): 2269-76.

- Huleatt, J. W., A. R. Jacobs, et al. (2007). "Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity." Vaccine **25**(4): 763-75.
- Huster, K. M., V. Busch, et al. (2004). "Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5610-5.
- Huster, K. M., M. Koffler, et al. (2006). "Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells." Eur J Immunol **36**(6): 1453-64.
- Igwe, E. I., H. Russmann, et al. (1999). "Rational live oral carrier vaccine design by mutating virulence-associated genes of Yersinia enterocolitica." Infect Immun **67**(10): 5500-7.
- Iriarte, M. and G. R. Cornelis (1998). "YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells." Mol Microbiol **29**(3): 915-29.
- Isberg, R. R. and P. Barnes (2001). "Subversion of integrins by enteropathogenic Yersinia." J Cell Sci **114**(Pt 1): 21-28.
- Jackson, M. W. and G. V. Plano (2000). "Interactions between type III secretion apparatus components from Yersinia pestis detected using the yeast two-hybrid system." FEMS Microbiol Lett **186**(1): 85-90.
- Jacobi, C. A., A. Roggenkamp, et al. (1998). "In vitro and in vivo expression studies of yopE from Yersinia enterocolitica using the gfp reporter gene." Mol Microbiol **30**(4): 865-82.
- Janknecht, R., G. de Martynoff, et al. (1991). "Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 8972-6.
- Jensen, F. C., J. R. Savary, et al. (1998). "Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant." Adv Drug Deliv Rev **32**(3): 173-186.
- Journet, L., C. Agrain, et al. (2003). "The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler." Science **302**(5651): 1757-60.
- Juris, S. J., F. Shao, et al. (2002). "Yersinia effectors target mammalian signalling pathways." Cell Microbiol **4**(4): 201-11.
- Kagi, D., B. Ledermann, et al. (1996). "Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo." Annu Rev Immunol **14**: 207-32.
- Kamogawa, Y., L. A. Minasi, et al. (1993). "The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells." Cell **75**(5): 985-95.
- Kane, J. F. (1995). "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli." Curr Opin Biotechnol **6**(5): 494-500.
- Karow, M. and C. Georgopoulos (1992). "Isolation and characterization of the Escherichia coli msbB gene, a multicopy suppressor of null mutations in the high-temperature requirement gene htrB." J Bacteriol **174**(3): 702-10.

- Kempf, V. A., E. Bohn, et al. (1998). "In vivo tracking and protective properties of Yersinia-specific intestinal T cells." Clin Exp Immunol **113**(3): 429-37.
- Kerschen, E. J., D. A. Cohen, et al. (2004). "The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells." Infect Immun **72**(8): 4589-602.
- Kobe, B. and A. V. Kajava (2001). "The leucine-rich repeat as a protein recognition motif." Curr Opin Struct Biol **11**(6): 725-32.
- Kohler, S., M. Leimeister-Wachter, et al. (1990). "The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*." Infect Immun **58**(6): 1943-50.
- Kubori, T., Y. Matsushima, et al. (1998). "Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system." Science **280**(5363): 602-5.
- Lauvau, G., S. Vihj, et al. (2001). "Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine." Science **294**(5547): 1735-9.
- Leary, S. E., E. D. Williamson, et al. (1995). "Active immunization with recombinant V antigen from *Yersinia pestis* protects mice against plague." Infect Immun **63**(8): 2854-8.
- Lechler, R., G. Aichinger, et al. (1996). "The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation." Immunol Rev **151**: 51-79.
- Leclerc, C. and J. Ronco (1998). "New approaches in vaccine development." Immunol Today **19**(7): 300-2.
- Lee, V. T., D. M. Anderson, et al. (1998). "Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone." Mol Microbiol **28**(3): 593-601.
- Lee, V. T., C. Tam, et al. (2000). "LcrV, a substrate for *Yersinia enterocolitica* type III secretion, is required for toxin targeting into the cytosol of HeLa cells." J Biol Chem **275**(47): 36869-75.
- Leung, K. Y., B. S. Reisner, et al. (1990). "YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice." Infect Immun **58**(10): 3262-71.
- Levine, M. M. and G. Dougan (1998). "Optimism over vaccines administered via mucosal surfaces." Lancet **351**(9113): 1375-6.
- Logsdon, L. K. and J. Meccas (2003). "Requirement of the *Yersinia pseudotuberculosis* effectors YopH and YopE in colonization and persistence in intestinal and lymph tissues." Infect Immun **71**(8): 4595-607.
- Lutz, M. B., N. Kukutsch, et al. (1999). "An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow." J Immunol Methods **223**(1): 77-92.
- Marenne, M. N., L. Journet, et al. (2003). "Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, YscF and YopN." Microb Pathog **35**(6): 243-58.
- Marketon, M. M., R. W. DePaolo, et al. (2005). "Plague bacteria target immune cells during infection." Science **309**(5741): 1739-41.
- Marranzano, M., A. Agodi, et al. (1993). "Molecular characterization of *Yersinia* strains isolated from human and environmental sources." New Microbiol **16**(1): 57-62.

- Marston, F. A. and D. L. Hartley (1990). "Solubilization of protein aggregates." Methods Enzymol **182**: 264-76.
- Masopust, D., V. Vezys, et al. (2004). "Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin." J Immunol **172**(8): 4875-82.
- Matson, J. S. and M. L. Nilles (2001). "LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*." J Bacteriol **183**(17): 5082-91.
- McDonald, C., P. O. Vacratsis, et al. (2003). "The yersinia virulence factor YopM forms a novel protein complex with two cellular kinases." J Biol Chem **278**(20): 18514-23.
- Medina, E. and C. A. Guzman (2001). "Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations." Vaccine **19**(13-14): 1573-80.
- Meijer, L. K., K. Schesser, et al. (2000). "The bacterial protein YopJ abrogates multiple signal transduction pathways that converge on the transcription factor CREB." Cell Microbiol **2**(3): 231-8.
- Michalek, S. M., A. A. Lackner, et al. (1995). "Oral immunization studies with *Streptococcus mutans* and influenza vaccines in rhesus macaque monkeys." Adv Exp Med Biol **371B**: 1423-9.
- Mills, S. D., A. Boland, et al. (1997). "Yersinia enterocolitica induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12638-43.
- Monack, D. M., J. Meccas, et al. (1997). "Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10385-90.
- Morrison, L. A., A. E. Lukacher, et al. (1986). "Differences in antigen presentation to MHC class I- and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones." J Exp Med **163**(4): 903-21.
- Motin, V. L., R. Nakajima, et al. (1994). "Passive immunity to yersiniae mediated by anti-recombinant V antigen and protein A-V antigen fusion peptide." Infect Immun **62**(10): 4192-201.
- Mueller, C. A., P. Broz, et al. (2005). "The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles." Science **310**(5748): 674-6.
- Mukherjee, S., G. Keitany, et al. (2006). "Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation." Science **312**(5777): 1211-4.
- Mulder, B., T. Michiels, et al. (1989). "Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227." Infect Immun **57**(8): 2534-41.
- Nakajima, R., V. L. Motin, et al. (1995). "Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization." Infect Immun **63**(8): 3021-9.
- Neyt, C. and G. R. Cornelis (1999). "Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG." Mol Microbiol **33**(5): 971-81.

- Orth, K., L. E. Palmer, et al. (1999). "Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector." *Science* **285**(5435): 1920-3.
- Pamer, E. and P. Cresswell (1998). "Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing." *Annu Rev Immunol* **16**: 323-58.
- Pepe, J. C. and V. L. Miller (1993). "The biological role of invasins during a Yersinia enterocolitica infection." *Infect Agents Dis* **2**(4): 236-41.
- Persson, C., R. Nordfelth, et al. (1995). "Cell-surface-bound Yersinia translocate the protein tyrosine phosphatase YopH by a polarized mechanism into the target cell." *Mol Microbiol* **18**(1): 135-50.
- Pettersson, J., A. Holmstrom, et al. (1999). "The V-antigen of Yersinia is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation." *Mol Microbiol* **32**(5): 961-76.
- Pilz, D., T. Vocke, et al. (1992). "Mechanism of YadA-mediated serum resistance of Yersinia enterocolitica serotype O3." *Infect Immun* **60**(1): 189-95.
- Porath, J., J. Carlsson, et al. (1975). "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation." *Nature* **258**(5536): 598-9.
- Portnoy, D. A. and R. J. Martinez (1985). "Role of a plasmid in the pathogenicity of Yersinia species." *Curr Top Microbiol Immunol* **118**: 29-51.
- Rabson, A. R., A. F. Hallett, et al. (1975). "Generalized Yersinia enterocolitica infection." *J Infect Dis* **131**(4): 447-51.
- Roggenkamp, A., A. M. Geiger, et al. (1997). "Passive immunity to infection with Yersinia spp. mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen." *Infect Immun* **65**(2): 446-51.
- Roggenkamp, A., L. Leitritz, et al. (1999). "Anti-recombinant V antigen serum promotes uptake of Yersinia enterocolitica serotype O8 by macrophages." *Med Microbiol Immunol* **188**(3): 151-9.
- Rosqvist, R., A. Forsberg, et al. (1991). "Microinjection of the Yersinia YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption." *Biochem Soc Trans* **19**(4): 1131-2.
- Rosqvist, R., K. E. Magnusson, et al. (1994). "Target cell contact triggers expression and polarized transfer of Yersinia YopE cytotoxin into mammalian cells." *EMBO J* **13**(4): 964-72.
- Ruckdeschel, K., S. Harb, et al. (1998). "Yersinia enterocolitica impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production." *J Exp Med* **187**(7): 1069-79.
- Ruckdeschel, K., O. Mannel, et al. (2001). "Yersinia outer protein P of Yersinia enterocolitica simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages." *J Immunol* **166**(3): 1823-31.
- Ruckdeschel, K., A. Roggenkamp, et al. (1996). "Differential contribution of Yersinia enterocolitica virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils." *Infect Immun* **64**(3): 724-33.
- Rudensky, A., P. Preston-Hurlburt, et al. (1991). "Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules." *Nature* **353**(6345): 622-7.

- Rüssmann, H., U. Gerdemann, et al. (2003). "Attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction." Infect Immun **71**(6): 3463-72.
- Rüssmann, H., E. I. Igwe, et al. (2001). "Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing hybrid *Yersinia* type III proteins." J Immunol **167**(1): 357-65.
- Rüssmann, H., A. Weissmuller, et al. (2000). "*Yersinia enterocolitica*-mediated translocation of defined fusion proteins to the cytosol of mammalian cells results in peptide-specific MHC class I-restricted antigen presentation." Eur J Immunol **30**(5): 1375-84.
- Sarker, M. R., C. Neyt, et al. (1998). "The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD." J Bacteriol **180**(5): 1207-14.
- Sauvonnet, N., B. Pradet-Balade, et al. (2002). "Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors." J Biol Chem **277**(28): 25133-42.
- Schesser, K., E. Frithz-Lindsten, et al. (1996). "Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes." J Bacteriol **178**(24): 7227-33.
- Schesser, K., A. K. Spiik, et al. (1998). "The yopJ locus is required for *Yersinia*-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity." Mol Microbiol **28**(6): 1067-79.
- Schulze-Koops, H., H. Burkhardt, et al. (1993). "Outer membrane protein YadA of enteropathogenic *Yersinia* mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin." Infect Immun **61**(6): 2513-9.
- Seder, R. A. and W. E. Paul (1994). "Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells." Annu Rev Immunol **12**: 635-73.
- Shao, F., P. M. Merritt, et al. (2002). "A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis." Cell **109**(5): 575-88.
- Shata, M. T., L. Stevceva, et al. (2000). "Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors." Mol Med Today **6**(2): 66-71.
- Shayegani, M., I. DeForge, et al. (1981). "Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human, animal, and environmental sources." J Clin Microbiol **14**(3): 304-12.
- Shresta, S., C. T. Pham, et al. (1998). "How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?" Curr Opin Immunol **10**(5): 581-7.
- Sing, A. (2005). "Molekulare Charakterisierung der immunmodulatorischen Wirkung des *Yersinia* Virulenzantigens LcrV." Habilitationsschrift der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Sing, A., D. Reithmeier-Rost, et al. (2005). "A hypervariable N-terminal region of *Yersinia* LcrV determines Toll-like receptor 2-mediated IL-10 induction and mouse virulence." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 16049-54.

- Skoberne, M., S. Schenk, et al. (2002). "Cross-presentation of *Listeria monocytogenes*-derived CD4 T cell epitopes." J Immunol **169**(3): 1410-8.
- Skrzypek, E., C. Cowan, et al. (1998). "Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus." Mol Microbiol **30**(5): 1051-65.
- Slifka, M. K. and R. Ahmed (1998). "Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production." Curr Opin Immunol **10**(3): 252-8.
- Snellings, N. J., M. Popek, et al. (2001). "Complete DNA sequence of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:8 low-calcium-response plasmid reveals a new virulence plasmid-associated replicon." Infect Immun **69**(7): 4627-38.
- Somerville, J. E., Jr., L. Cassiano, et al. (1996). "A novel *Escherichia coli* lipid A mutant that produces an antiinflammatory lipopolysaccharide." J Clin Invest **97**(2): 359-65.
- Somerville, J. E., Jr., L. Cassiano, et al. (1999). "*Escherichia coli* msbB gene as a virulence factor and a therapeutic target." Infect Immun **67**(12): 6583-90.
- Sorg, I., U. M. Goehring, et al. (2001). "Recombinant *Yersinia* YopT leads to uncoupling of RhoA-effector interaction." Infect Immun **69**(12): 7535-43.
- Sory, M. P., A. Boland, et al. (1995). "Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 11998-2002.
- Sory, M. P. and G. R. Cornelis (1994). "Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells." Mol Microbiol **14**(3): 583-94.
- Sprent, J. and C. D. Surh (2001). "Generation and maintenance of memory T cells." Curr Opin Immunol **13**(2): 248-54.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-30.
- Sun, J. C. and M. J. Bevan (2003). "Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help." Science **300**(5617): 339-42.
- Takeda, K. and S. Akira (2004). "TLR signaling pathways." Semin Immunol **16**(1): 3-9.
- Tardy, F., F. Homble, et al. (1999). "*Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops." EMBO J **18**(23): 6793-9.
- Tauxe, R. V., J. Vandepitte, et al. (1987). "*Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link." Lancet **1**(8542): 1129-32.
- Tizard, J. R. (1981). Grundlagen der Immunreaktion
In: Einführung in die veterinärmedizinische Immunologie für Tiermediziner, Biologen und Agrarwissenschaftler Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg 1-9.
- Townsend, A. and H. Bodmer (1989). "Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes." Annu Rev Immunol **7**: 601-24.
- Troisfontaines, P. and G. R. Cornelis (2005). "Type III secretion: more systems than you think." Physiology (Bethesda) **20**: 326-39.

- Trosky, J. E., A. D. Liverman, et al. (2008). "Yersinia outer proteins: Yops." Cell Microbiol **10**(3): 557-65.
- Trülsch, K., G. Geginat, et al. (2005). "Yersinia outer protein P inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model." J Immunol **174**(7): 4244-51.
- Trülsch, K., A. Roggenkamp, et al. (2003). "Analysis of chaperone-dependent Yop secretion/translocation and effector function using a mini-virulence plasmid of Yersinia enterocolitica." Int J Med Microbiol **293**(2-3): 167-77.
- Trülsch, K., T. Sporleder, et al. (2004). "Contribution of the major secreted yops of Yersinia enterocolitica O:8 to pathogenicity in the mouse infection model." Infect Immun **72**(9): 5227-34.
- Van Damme, M., M. P. Sory, et al. (1992). "Oral immunization against cholera toxin with a live Yersinia enterocolitica carrier in mice." Gastroenterology **103**(2): 520-31.
- van Ginkel, F. W., H. H. Nguyen, et al. (2000). "Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases." Emerg Infect Dis **6**(2): 123-32.
- Vijh, S. and E. G. Pamer (1997). "Immunodominant and subdominant CTL responses to Listeria monocytogenes infection." J Immunol **158**(7): 3366-71.
- Vogel, U., I. B. Autenrieth, et al. (1993). "Role of plasmid-encoded antigens of Yersinia enterocolitica in humoral immunity against secondary Y. enterocolitica infection in mice." Microb Pathog **15**(1): 23-36.
- von Boehmer, H. (1994). "Positive selection of lymphocytes." Cell **76**(2): 219-28.
- Von Pawel-Rammingen, U., M. V. Telepnev, et al. (2000). "GAP activity of the Yersinia YopE cytotoxin specifically targets the Rho pathway: a mechanism for disruption of actin microfilament structure." Mol Microbiol **36**(3): 737-48.
- Wherry, E. J., V. Teichgraber, et al. (2003). "Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets." Nat Immunol **4**(3): 225-34.
- Yang, Y. and R. R. Isberg (1993). "Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the Yersinia pseudotuberculosis yadA product." Infect Immun **61**(9): 3907-13.
- Yao, T., J. Mecsas, et al. (1999). "Suppression of T and B lymphocyte activation by a Yersinia pseudotuberculosis virulence factor, yopH." J Exp Med **190**(9): 1343-50.
- Yeremeev, V. V., T. K. Kondratieva, et al. (2003). "Proteins of the Rpf family: immune cell reactivity and vaccination efficacy against tuberculosis in mice." Infect Immun **71**(8): 4789-94.
- Yersin, A. (1994). "[Bubonic plague in Hong Kong. 1894]." Rev Med Suisse Romande **114**(5): 393-5.
- Zaph, C., J. Uzonna, et al. (2004). "Central memory T cells mediate long-term immunity to Leishmania major in the absence of persistent parasites." Nat Med **10**(10): 1104-10.
- Zhang, Y., A. T. Ting, et al. (2005). "Inhibition of MAPK and NF-kappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with Yersinia." J Immunol **174**(12): 7939-49.
- Zhang, Z. Y., J. C. Clemens, et al. (1992). "Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant Yersinia protein tyrosine phosphatase." J Biol Chem **267**(33): 23759-66.

Zinkernagel, R. M. (2000). "On immunological memory." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **355**(1395): 369-71.

Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature **248**(450): 701-2.

Zumbihl, R., M. Aepfelbacher, et al. (1999). "The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA." J Biol Chem **274**(41): 29289-93.

PUBLIKATIONSLISTE

Leibiger, R., K. Niedung, et al. (2008). "Yersinia enterocolitica Yop mutants as oral live carrier vaccines." *Vaccine*.

Trulzsch, K., R. Leibiger, et al. (2008). "Yersinia as oral live carrier vaccine: influence of Yersinia outer proteins (Yops) on the T-cell response." *Int J Med Microbiol* 298(1-2): 59-67.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Rudi Vogel für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens bedanken. Auch dafür, daß er sich ohne zu zögern bereit erklärt hat, diese Arbeit in der Fakultät des WZW der TU München zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit am Max von Pettenkofer-Institut der LMU München durchführen zu können, sowie für das Thema der Entwicklung des Totimpfstoffes.

Besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. Konrad Trülzsch für die Bereitstellung des spannenden Themas der Lebendvakzinentwicklung, die Betreuung, die Diskussionsbereitschaft, die vielen Möglichkeiten und Anregungen, die er mir im Bereich der Forschung gegeben hat, bedanken. Aber auch für seine Geduld und Unterstützung.

Ein großer Dank geht auch an meine Kollegin und Platz-Nachbarin Katy Niedung, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und für ihre Hilfe v.a. im Tierstall.

Mein Dank geht auch an Katy, Svea, Annika, Eva und Julia für die schöne, lustige gemeinsame Zeit während als auch außerhalb des Labors.

Ferner gilt mein Dank auch den Kollegen, die ich während meiner Arbeit am Max von Pettenkofer-Institut kennen und schätzen gelernt habe, sowie allen, die mir mit Rat oder Tat beiseite standen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie und engsten Freunde, die stets für mich da waren und mich bei der Verwirklichung meiner Ziele unterstützt haben.