

Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Lehrstuhl für Mikrobiologie

Interaktion humaner dendritischer Zellen mit *Listeria monocytogenes*

Dissertation
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von

Dr. med. Annette Kolb-Mäurer

aus Darmstadt

Würzburg, 2001

Eingereicht am:

Vorsitzender der
Kommission:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt und von mir selbständig durchgeführt und verfasst wurde.

Die vorliegende Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Hiermit erkläre ich, dass ich, abgesehen vom „ Dr. med “, keine weiteren akademischen Grade erworben habe oder versucht habe solche zu erwerben.

Würzburg, den

Der experimentelle Teil dieser Doktorarbeit wurde von August 1998 bis Dezember 2000 am Lehrstuhl für Mikrobiologie des Theodor-Boveri-Instituts für Biowissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt.

Die Arbeit wurde vom Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung der Universität Würzburg im Rahmen des MD/PhD Programms gefördert (Bundesministerium für Bildung und Forschung, Az 01 KS9603).

Als Kooperationspartner waren in dieser Arbeit folgende Personen beteiligt:

PD Dr. I. Gentschev, Dr. E. Kämpgen, Dr A. McLellan, Prof. Dr. E.-B. Bröcker, Prof. Dr. G. Krohne, Prof. Dr. F. Fiedler, Dr. A. Bubert, Dr. G. Dietrich, S. Pilgrim und C. Gehrig.

Besonderem Dank gilt Herrn Prof. Dr. Goebel, der mir mit seiner wissenschaftlichen Unterstützung stets geholfen und dadurch einen großen Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit geleistet hat.

Neben der Hilfe vieler anderer Lehrstuhlmitarbeiter möchte ich mich besonders bei S. Pilgrim, J. Slaghuis und Dr. L. Greiffenberg für konstruktive Diskussionen bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern für die finanzielle und persönliche Unterstützung meines Studiums bedanken, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Bei meiner lieben Familie möchte ich mich von Herzen für die Geduld bedanken, durch die sie mir eine unbeschwerte Promotionszeit ermöglicht haben.

für Hannah, Jonas und Mathias

INHALTSVERZEICHNIS

1 Zusammenfassung	10
2 Einleitung	11
2.1 Dendritische Zellen und ihre immunologische Bedeutung	11
2.1.1 Antigenaufnahme unreifer DZ	11
2.1.2 Entwicklung unreifer DZ zu reifen DZ	12
2.1.3 Morphologie der DZ	13
2.1.4 Aktivierung naiver CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-Zellen	13
2.1.5 Stimuli, die zur Reifung DZ führen	14
2.2 Apoptose	15
2.2.1 Physiologische Bedeutung der Apoptose	15
2.2.2 Phasen der Apoptose	15
2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	16
2.3.1 Pathogenese	16
2.3.2 Infektionszyklus von <i>L. monocytogenes</i>	17
2.3.3 LTA: Bestandteil der Zellwand Gram-positiver Bakterien	18
2.3.4 Internaline	19
2.3.5 p60 Protein	19
2.3.6 Das Virulenzgenkluster	20
2.3.7 <i>L. monocytogenes</i> als Vektor für DNA-Vakzinierung	21
2.4 Zielsetzung der Arbeit	22
3 Material	23
3.1 Bakterienstämme	23
3.2 Vektoren und Plasmide	24
3.3 Lösungen, Puffer, Chemikalien	24
3.4 Zytokine	27
3.5 Monoklonaler Antikörper für die Durchflusszytometrie und Immunoblots	27
3.6 Verbrauchsmaterial für Bakterien und Zellkultur	28
3.7 Medien für die Bakterienkultur	28
3.8 Geräte	29
4 Methoden	31
4.1 Bakterienkultur	31

4.2	Elektrotransformation	31
4.2.1	Herstellung elektrokompeter <i>Salmonellen</i> und <i>Yersinien</i>	31
4.2.2	Elektrotransformation von Plasmid-DNA in Bakterien.....	31
4.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA	32
4.3	Zellkultur	32
4.3.1	Generelle Hinweise zum Arbeiten mit DZ	32
4.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	32
4.3.3	Bestimmung der Bakterienlebendzellzahl mit Hilfe von Tryptanblau.....	32
4.4	Kultivierung von humanen Mo-DZ aus peripherem Blut.....	33
4.5	Kultivierung von humanen Makrophagen aus peripherem Blut.....	34
4.6	Durchflusszytometrische-Analysen	34
4.7	Isolierung von T-Lymphozyten aus peripherem Blut mit Hilfe von Schafserythrozyten	34
4.8	Gemischte Leukozytenreaktion (MLR).....	35
4.9	Infektion DZ mit Bakterien.....	35
4.9.1	Aufnahmehemmung.....	36
4.9.2	Präadsorption von humanen Immunglobulinen.....	36
4.10	Detektion intrazellulär aufgenommener Bakterien	36
4.10.1	Fluoreszenzmikroskopie	36
4.10.2	Giemsa-Färbung	36
4.10.3	Bestimmung der intrazellulären Lebendbakterienzahl (CFU).....	37
4.10.4	Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der intrazellulären Bakterienanzahl .	37
4.10.5	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	38
4.10.6	Raster-Elektronenmikroskopie (Raster-EM).....	38
4.11	Bestimmung der Adhärenz von Bakterien an DZ	38
4.12	Untersuchung von apoptotischen und nekrotischen Zelltod.....	39
4.12.1	Beurteilung des apoptotischen/nekrotischen Zelltods über die Zellmorphologie	39
4.12.2	Beurteilung des hypodiploiden, apoptotischen Zellkerns mit Hilfe der Durchflusszytometrie	40
4.12.3	Nachweis von apoptotischen DNA Fragmenten.....	40
4.13	Immunoblots	41
4.14	Statistik	42
4.14.1	Standardabweichung	42

5	Ergebnisse	43
5.1	Charakterisierung von Mo-DZ	43
5.2	Humane Mo-DZ phagozytieren <i>L. monocytogenes</i>	44
5.2.1	Nachweis von intrazellulären <i>L. monocytogenes</i> mittels TEM und Lichtmikroskopie nach Giemsa-Färbung	46
5.2.2	Nachweis zytosolischer <i>L. monocytogenes</i> mit GFP-exprimierenden Bakterienstamm	47
5.2.3	Bestimmung der Lebendbakterienzellzahl (CFU)	49
5.2.4	Inkubation reifer DZ mit <i>L. monocytogenes</i>	50
5.3	Charakterisierung von Faktoren, welche die Aufnahme von <i>L. monocytogenes</i> in humane Mo-DZ beeinflussen	51
5.3.1	Beurteilung des Aufnahmeprozesses mit der TEM	51
5.3.2	Humanes Plasma steigert die Aufnahme von <i>L. monocytogenes</i> in Mo-DZ	52
5.3.3	Die Aufnahme von <i>S. typhimurium</i> und <i>Y. enterocolitica</i> durch Mo-DZ wird nicht durch humanes Plasma gesteigert	54
5.3.4	Die gesteigerte listerielle Aufnahme in Anwesenheit von humanem Plasma ist durch Immunglobulin-Opsonisierung der <i>Listerien</i> bedingt	55
5.3.5	Anti-CD16 Antikörper reduzieren die Phagozytose von <i>L. monocytogenes</i> in Mo-DC	59
5.3.6	Antikörper gegen listerielle p60 Protein agieren als wichtigstes Opsonin für die Aufnahme von <i>L. monocytogenes</i> in Mo-DZ	59
5.4	Veränderter Phänotyp <i>L. monocytogenes</i> -infizierter DZ	62
5.4.1	Morphologische Veränderung <i>Listerien</i> -infizierter DZ	62
5.4.2	Veränderte Oberflächenmolekül-Expression <i>Listerien</i> -infizierter DZ	62
5.5	Untersuchung listerieller Faktoren, die Reifung der infizierten DZ induzieren	65
5.5.1	Listerielle LTA induziert Reifung in humanen MO-DZ	66
5.6	<i>L. monocytogenes</i> -infizierte Mo-DZ aktivieren allogene T-Lymphozyten	69
5.7	Untersuchung des Zelltods <i>Listerien</i> -infizierter DZ	70
	Eukaryontische Antigenexpressionsvektoren gelangen mit Hilfe von Bakterien in humane Mo-DZ	74
5.8.1	<i>L. monocytogenes</i> als Träger von eukaryontischen Expressionsvektoren	75

5.8.2	<i>S. typhimurium</i> und <i>Y. enterocolitica</i> als Träger von eukaryontischen Expressionsvektoren.....	75
6	Diskussion.....	77
6.1	<i>L. monocytogenes</i> wird in humane Mo-DZ aufgenommen.....	77
6.2	Anti p60-Antikörper beeinflussen die Phagozytose von <i>L. monocytogenes</i> in humane Mo-DZ	78
6.3	<i>L. monocytogenes</i> wird im Phagosom der humanen MO-DZ abgetötet..	82
6.4	<i>L. monocytogenes</i> -infizierte DZ reifen zu immunstimulatorischen Zellen heran	84
6.5	Listerielle LTA: Faktor zur Reifung DZ	85
6.6	DZ überleben Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	86
6.7	Dendritische Zellen als Ziel für DNA Vakzinierung.....	87
6.8	<i>L. monocytogenes</i> als DNA-Carrier	89
6.9	Ausblicke.....	90
7	Literatur	92
8	Anhang.....	109
8.1	Abkürzungen.....	109
8.2	Summary.....	111
8.3	Curriculum Vitae	112
8.4	Publikationsliste	114
8.4.1	Originalarbeiten.....	114
8.4.2	Abstracts.....	115

1 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DZ) aktivieren naive CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und spielen daher die entscheidende Rolle bei der Auslösung einer Immunantwort gegenüber pathogenen Mikroorganismen.

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von DZ mit *Listeria monocytogenes* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* effizient in unreife, humane DZ aufgenommen wird. Die Phagozytoserate von *L. monocytogenes* unter Zugabe von humanem Plasma war wesentlich höher als im Plasma-freien Medium oder Medium mit fötalem Kälberserum (FCS). Die Zugabe von Immunglobulinen führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Phagozytose von *L. monocytogenes* in humane DZ, der mit der Phagozytoserate bei Zugabe von humanem Plasma vergleichbar war. Plasma von gesunden Spendern enthielt Antikörper gegen das listerielle Oberflächenprotein p60. Durch die Verwendung einer p60 Deletionsmutante konnte gezeigt werden, dass der p60 Antikörper das Haupt-Opsonin für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Mo-DZ darstellt. Die Aufnahmerate dieser Mutante zeigte nur geringe Differenzen bei An- oder Abwesenheit von humanem Plasma während der Inkubationszeit, was den Schluss zulässt, dass Immunglobuline gegen das Oberflächenprotein p60 von *L. monocytogenes* und anderen apathogenen *Listerien*, für die effiziente Phagozytose verantwortlich sind.

Nach Aufnahme der *Listerien* befanden sich die meisten (> 95 %) DZ in Membrangrenzten Phagosomen und sehr selten frei im Zytosol. Die Mehrzahl der *Listerien* wurde im Phagosom der humanen DZ effizient lysiert. *L. monocytogenes*-infizierte DZ entwickelten sich phänotypisch zu reifen DZ. Die durch *Listerien* ausgelöste Maturation der DZ ließen sich durch die Zugabe von listerieller Lipoteichonsäure (LTA) nachahmen. Obwohl bekannt ist, dass eine Listerieninfektion in anderen Zellkulturen Zelltod induziert, führte die Infektion humaner DZ lediglich in weniger als 20% der infizierten DZ zur Nekrose. Apoptotischer Zelltod konnte nicht nachgewiesen werden. Die Interaktion humaner DZ mit *L. monocytogenes* könnte somit eine Verbreitung der Bakterien im Organismus verhindern.

Langfristig gesehen ergeben die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Interaktion DZ mit *L. monocytogenes* Erkenntnisse zur Entwicklung neuer DNA-Vakzinierungsstrategien mit *L. monocytogenes* als DNA-Träger.

2 Einleitung

2.1 Dendritische Zellen und ihre immunologische Bedeutung

Zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort gegen intrazelluläre Mikroorganismen sind dendritische Zellen (DZ) als professionelle, antigenpräsentierende Zellen (APZ) von entscheidender Bedeutung (Reis e Soussa *et al.*, 1999). Es werden zwei DZ Typen mit unterschiedlichem Ursprung und Funktion beschrieben: lymphoide und myeloide DZ (Vandenabeele und Wu, 1999; McLellan und Kämpgen, 2000). Lymphoide DZ befinden sich im Thymusmark und in T-Zell Zone der Lymphknoten, wo sie eine immunregulatorische Funktion ausüben. Myeloide DZ entwickeln sich in Gegenwart von aktivierenden Zytokinen aus knochenmarksständigen Vorläuferzellen (Steinman und Inaba, 1999). Sie siedeln als spezialisierte Wächterzellen des Immunsystems in nahezu allen Organen, insbesondere an Orten vermehrter Antigenexposition wie der Haut und den Schleimhäuten. In diesen Geweben besitzt die ruhende, unreife DZ eine hohe Phagozytosekapazität. Sie ist durch viele saure endosomale Organellen, in denen Antigenprozessierung stattfinden kann, gekennzeichnet. Die Expression von Oberflächenmarkern, die der Antigenpräsentation dienen, wie zum Beispiel kostimulatorische Moleküle und Moleküle des Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) ist jedoch nur gering ausgeprägt. Dies erklärt die geringe Bindungsfähigkeit unreifer DZ an naive T-Zellen. Unreife DZ sind somit schwache T-Zell Stimulatoren (Abb.1).

2.1.1 Antigenaufnahme unreifer DZ

Dringen Mikroorganismen oder Fremdkörper ins Gewebe ein, werden die Antigene von unreifen DZ aufgenommen (Zusammenfassung: Banchereau und Steinman, 1998). Unreife DZ besitzen dafür verschiedene Eigenschaften. Zum einen können DZ eingedrungene Mikroorganismen und Partikel über Phagozytose aufnehmen (Inaba *et al.*, 1993). Desweiteren ist Makropinozytose für humane und murine DZ beschrieben worden (Sallusto *et al.*, 1995). Zusätzlich sind DZ mit Makrophagen-

Mannose-Rezeptoren ausgestattet. Außerdem finden sich Komplement- (CR3) und FC-Rezeptoren (FC γ RI/RII/RIII, FC ϵ RI) (Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Fanger *et al.*, 1996). Im Unterschied zur Makropinozytose führt eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Antigenen in DZ zu einer wesentlich effizienteren Antigenpräsentation (Tan *et al.*, 1997).

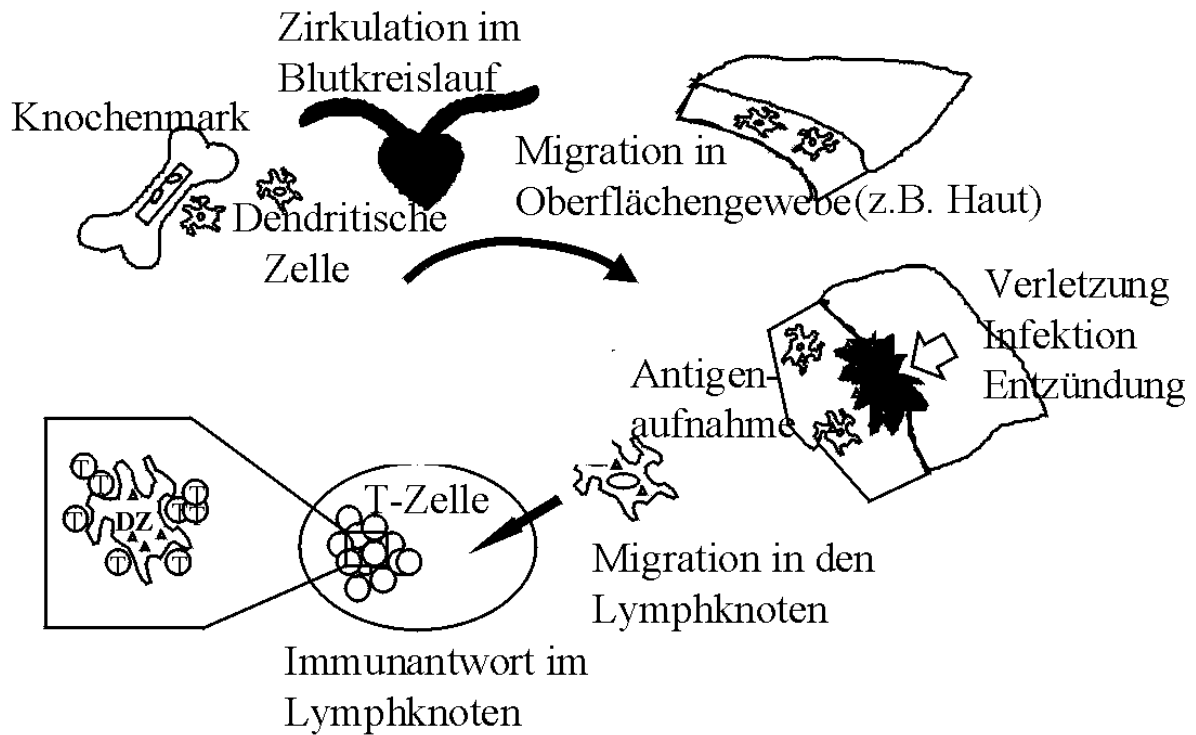


Abb. 1
Lebenszyklus DZ

2.1.2 Entwicklung unreifer DZ zu reifen DZ

Die Aufnahme von Antigenen führt zur Aktivierung von DZ mit Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β). Dadurch werden weitere Immunzellen rekrutiert. Die aktivierten DZ wandern nun über die Lymphbahnen zu den Lymphknoten. Dabei wird die Migration von unterschiedlichen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β beeinflusst (Arnoldi und Moll, 1998). Während der Migrationprozessieren DZ die phagozytierten Antigene und differenzieren sich zu reifen DZ (O'Doherty *et al.*, 1994, Winzler *et al.*, 1997). Die durch die phagosomale Prozessierung entstandenen Peptid-Epitope werden an die

Moleküle des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC Klasse II) gebunden und anschließend naiven T-Lymphozyten im Lymphknoten präsentiert (Svensson *et al.*, 1997). Reife DZ sind durch eine hohe Oberflächenexpression von kostimulatorischen Molekülen und MHC Klasse II gekennzeichnet (Banchereau und Steinman, 1998).

2.1.3 Morphologie der DZ

Die Funktion der DZ spiegelt sich in der charakteristischen Morphologie wider. Sternförmig strahlen Segel vom runden Zellkörper in alle Richtungen aus, die sich nach Zentrifugation der DZ auf einem Objektträger als lange, feine Zytoplasmaausläufer darstellen. Diese beweglichen Fortsätze sind bei der noch unreifen DZ plump und in geringerer Anzahl. Sie nutzen diese beim Einfangen von Antigen. Bei der reifen DZ sind diese nun filigranen Zytoplasmaausläufer stark vermehrt.

2.1.4 Aktivierung naiver CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen

In Folge des Zellkontakts zwischen antigenpräsentierenden DZ und den antigenspezifischen T-Zellen, bei dem die kostimulatorischen Signale CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) und die adhäsionswirksamen Moleküle CD54 (ICAM-1) und CD58 (LFA-3) der ausdifferenzierten DZ eine entscheidende Rolle spielen, kommt es zur Aktivierung und Vermehrung der T-Lymphozyten. B7-1 und B7-2 regulieren zusammen mit ihren Rezeptoren CD28 und CTLA-4 einen dominierenden kostimulatorischen Weg der T-Zell Antwort (Caux *et al.*, 1994; Inaba *et al.*, 1994). Aktiviert durch reife DZ setzen T-Zellen die Immunantwort fort, indem sie als CD4⁺ T-Zelle Zytokine freisetzen und mit anderen Zellen wie den B-Zellen und den Makrophagen interagieren oder als zytotoxische CD8⁺ T-Zelle Zielzellen lysieren. Durch das während der Antigenpräsentation vorhandene Zytokinmilieu wird die Richtung, in die sich naive CD4⁺ T-Helferzellen entwickeln, bestimmt. Durch die Interaktion zwischen CD40 auf der Oberfläche der DZ und ihrem auf den T-Zellen exprimierten Liganden produziert die DZ unter anderem IL-12, TNF- α , IL-6 und IL-8 (Cella *et al.*, 1996; Kalinski *et al.*, 1999; Zhou und Tedder, 1995). Eine Th₁-T-Zell Antwort mit Produktion von IL-2 und Interferon- γ (IFN- γ) wird vor allem durch die Anwesenheit von IL-12 gefördert (Übersicht: Kaufmann, 1993).

Mikroorganismen, die im Phagosom persistieren, wie zum Beispiel Salmonellen und Mykobakterien werden von phagosomalen Proteasen prozessiert und bevorzugt zusammen mit MHC Klasse II-Molekülen CD4⁺ T-Helferzellen präsentiert (Ingulli *et*

al., 1997). Im Unterschied dazu werden zytosolische Fremdproteine, die u.a. von Viren oder zytosolischen Bakterien stammen, von Proteasomen abgebaut. Die im Zytosol verdauten Antigene werden anschließend ins endoplasmatische Retikulum eingeschleust und dort an MHC Klasse I gebunden (Townsend und Trowsdal, 1993; Rock *et al.*, 1994). Über den Golgi-Apparat gelangen sie auf die Zelloberfläche und können nun, gebunden an MHC Klasse I Moleküle zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden.

DZ besitzen jedoch zusätzlich einen effizienten Mechanismus, um phagosomal verdaute Antigene ins Zytosol zu translozieren, und können somit phagosomale Fremdproteine in den sogenannten alternativen MHC Klasse I – Präsentationsweg einzuschleusen (Mitchell *et al.*, 1998; Watts, 1999, Rodriguez *et al.*, 1999). Regnault und Kollegen (1999) zeigten, dass insbesondere Immunglobulin-gekoppelte Antigene, die über den FC-Rezeptor in die DZ aufgenommen werden, in den alternativen MHC Klasse I – Weg gelangen. Das ist von entscheidender Bedeutung, da eine protektive Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene idealerweise sowohl CD4⁺ T-Helferzellen als auch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen einbeziehen sollte (Übersicht: Kaufmann, 1993).

Somit besitzt die DZ als professionell antigenpräsentierende Zelle, mit der Möglichkeit des alternativen MHC-I-Präsentationsweg eine Schlüsselrolle bei der Induktion einer Immunantwort gegen intrazelluläre Mikroorganismen. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die 10 bis 100 x höhere MHC Klasse II Expression verglichen mit Makrophagen (Banchereau und Steinman, 1998). Neben der hohen Expression der klassischen antigenpräsentierenden MHC Moleküle, exprimieren DZ auch CD1a auf ihrer Oberfläche. CD1a kann den T-Zellen „nicht-Protein“-Antigene präsentieren und spielt insbesondere bei Mykobakteriosen eine Rolle (Siegling *et al.*, 1999).

2.1.5 Stimuli, die zur Reifung DZ führen

Die ausgereifte DZ besitzt eine ausgeprägte Fähigkeit, naive T-Zellen zu stimulieren. Neben der Aufnahme von Bakterien (Winzler *et al.*, 1997; Rescigno *et al.*, 1999) gibt es noch weitere Stimuli, welche die Ausreifung der DZ induzieren, wie die Bindung des CD40-Liganden an die unreife DZ (Mellman *et al.*, 1998), ein Cocktail aus inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und Prostaglandin E (Romani *et al.*, 1996; Aiba, 1998), bakterielle Toxine wie Lipopolysaccharid (Granucci *et al.*, 1999; Riva *et al.*, 1996) und CpG-enthaltende Oligodesoxynukleotide (Jakob *et al.*, 1998; Sparwasser *et al.*, 1998). Marker für die Ausreifung von DZ sind die hoch

exprimierten kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-3, MHC Klasse II und CD83, ein spezifischer Reifemarker mit noch unbekannter Funktion. Der Nachweis dieser Oberflächenmoleküle lässt die Beurteilung des Funktionszustands der DZ zu und stellt in der Gesamtheit Kriterien für reife DZ dar. Reife DZ zeichnen sich, wie bereits beschrieben durch eine effektive Bindung an naive T-Zellen und deren Aktivierung aus, während die Fähigkeit der DZ zur Endozytose nach Ausreifung zurückgeht (Banchereau und Steinman, 1998).

Nach erfolgreicher Präsentation von Antigenen stirbt die ausgereifte DZ (Ingulli *et al.*; 1997). Lymphoide DZ in der T-Zell Region des Lymphknotens phagozytieren möglicherweise tote DZ und haben somit eine Bedeutung für die Regulierung der Immunantwort (Steinman und Inaba, 1999).

2.2 Apoptose

2.2.1 Physiologische Bedeutung der Apoptose

Apoptose spielt eine fundamentale Rolle im Organismus. Sie ist verantwortlich für die Homöostase von Geweben und für die Beseitigung von alten, verletzten, mutierten oder gefährlichen Zellen (Krammer, 2000). Apoptose beschreibt einen Zelltodmechanismus, der durch morphologische Besonderheiten wie Chromatinkondensation, Schrumpfung und Fragmentierung der Zelle charakterisiert ist. Die entstehenden apoptotischen Körperchen werden schließlich durch Nachbarzellen aufgenommen (Kerr *et al.*, 1972). Apoptose kann durch eine Reihe von verschiedenen Substanzen wie Hitzeschock, Bakterien und ihre Toxine, virale Infektion, Onkogene, Chemotherapeutika, UV-Strahlung, Steroidbehandlung und Ischämie ausgelöst werden (Thompson, 1995). Die große Anzahl an Apoptoseinduktoren und der Apoptose-Triggermechanismus können für einzelne Zellsysteme spezifisch sein (Wertz und Hanley, 1996).

2.2.2 Phasen der Apoptose

Es werden 3 Phasen der Apoptose unterschieden. Die Effektorphase ist durch einen intrazellulären Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels charakterisiert (Bellomo *et al.*, 1992). Dieser Ca^{2+} -Anstieg bewirkt eine Aktivierung von Endonukleasen, Transglutaminasen und zellulären Proteasen, die an der Apoptose beteiligt sind (Fesus *et al.*, 1991). Zusätzlich sind die Ca^{2+} -Ionen für die starken Veränderungen

des Zytoskeletts und damit für Zellmorphologie und Größe verantwortlich (Martin *et al.*, 1994). Apoptotische Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden, liegen im Zytosol als Proenzyme vor. Ein apoptotisches Signal induziert die Aktivierung einer initialen Caspase und löst somit eine Kaskade aus, die letztendlich für die proteolytische Zerstörung der Zelle verantwortlich ist (Thornberry und Lazebnik, 1998). Im weiteren Verlauf kommt es zur mitochondrialen Dysregulation. Eine Permeabilitätsstörung der mitochondrialen Poren führt zur veränderten Ionenverteilung und somit zum Verlust des Transmembranpotentials (Green und Reed, 1998). Im Anschluss an die Effektorphase folgt die Degradierungsphase, die durch den Abbau der Nukleinsäure und der zellulären Proteine gekennzeichnet ist. Die aktivierten Endonukleasen spalten die DNA zwischen den Nukleosomen, so dass DNA-Fragmente eines Vielfachen von 150-200 Basenpaaren entstehen. Die DNA-Fragmentierung dient der Zerstörung der Zellinformation und stellt somit einen irreversiblen Schritt in der Apoptose dar (Martin *et al.*, 1994). Während der „*Clearing*“ Phase entfernen Phagozyten die entstandenen apoptotischen Zellen und ihre Zellfragmente, ohne die Gesamtstruktur des Gewebes zu stören.

2.3 *Listeria monocytogenes*

2.3.1 Pathogenese

L. monocytogenes und die seltenere Art *L. ivanovii* sind unter den bisher 6 bekannten Arten der Gattung *Listeria* als fakultativ human und tierpathogene Spezies anzusehen (Seeliger, 1984). Alle *Listerien* kommen in der Natur (Erdboden, Wasser, Pflanzen, Tiere) weit verbreitet vor. *L. monocytogenes* wird auch häufig (10%) im Darm gesunder Menschen nachgewiesen (Gray und Killinger, 1966). Die Pathogenität der *Listerien* für Nagetiere beruht unter anderem auf ihre Fähigkeit, in murinen, antigenpräsentierenden Makrophagen zu überleben und sich in ihnen zu vermehren (Wilder und Edberg, 1973). Durch vorherige Aktivierung der murinen Makrophagen gelingt es diesen Zellen, aufgenommene *Listerien* im Phagosom abzutöten (Harrington-Fowler *et al.*, 1981). Dagegen können humane Makrophagen in der Regel phagozytierte *Listerien* auch ohne Aktivierung abtöten (Biroum-Noerjasin, 1977). Dennoch kann *L. monocytogenes* bei abwehrgeschwächten Individuen nach Aufnahme von kontaminierten Nahrungsmitteln eine Listeriose verursachen (Kampelmacher und van Noorle Jansen, 1972), die durch eine subakut

verlaufende Meningo-Enzephalitis gekennzeichnet ist. In schweren Verlaufsformen kommt es zur Septikämie, die häufig zum Tod des Patienten führt. Ereignet sich eine Listerieninfektion in der Schwangerschaft, können Bakterien auf den Embryo übertreten und zum Abort führen (Farber und Peterkin, 1991).

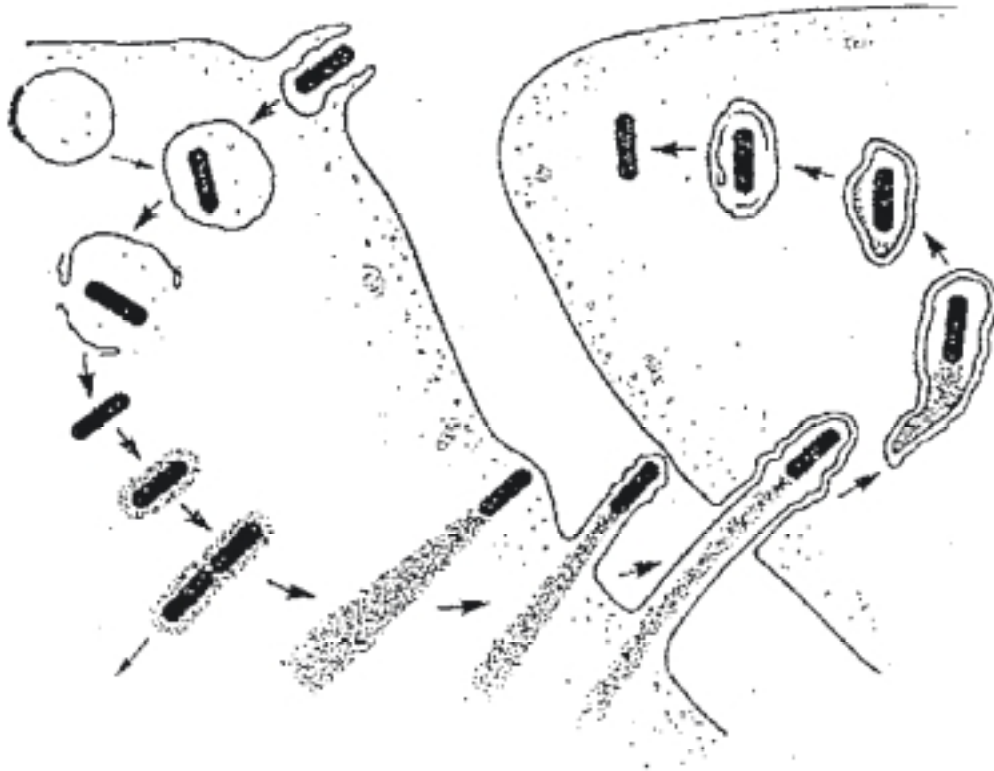


Abb. 2
Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

Die höhere Empfindlichkeit von Schwangeren gegenüber intrazellulären Infektionen wie der Listeriose liegt wahrscheinlich in der veränderten Th1/Th2 Balance zugunsten von Th2-Zellen. Zytokine der Th1-Antwort sind mit einer Schwangerschaft unvereinbar (Raghupathy, 1997). Eine Th-1 Antwort ist jedoch für die Überwindung intrazellulärer Infektionen notwendig (Kaufmann, 1993). Dies könnte die hohe Abortrate in der Frühschwangerschaft erklären.

2.3.2 Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

Die stäbchenförmigen *Listerien* vermehren sich bei Temperaturen von 1-48°C, und können aus diesem Grund gekühlte Lebensmittel wie Käse, Milch, Fleisch und Geflügel besiedeln (Hof *et al.*, 1993). Nach oraler Aufnahme der kontaminierten

Lebensmittel dringen die Bakterien über die Darmmukosa in den Wirt ein. Nachdem die Bakterien die Schleimhautoberfläche des Dünndarmepithels überwunden haben, kommen sie in Kontakt mit den Peyer-Plaques, einer Aggregation von Lymphfollikeln in denen auch enterale DZ vorkommen. Diese Plaques besitzen als Bestandteil des Immunsystems wichtige Funktionen der lokalen Immunabwehr (Kelsall und Strober, 1996). Gelingt es *Listerien*, diese Barriere zu überwinden, gelangen sie über die Blutbahn bevorzugt in Milz und Leber (Racz *et al.*, 1972). Währenddessen begegnet *L. monocytogenes* im Wirt verschiedenen Zelltypen wie Epithelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Anhand von *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* in der Lage ist, in verschiedene Säugetierzellen einzudringen (Cossart und Lecuit, 1998; Drevets *et al.*, 1995; Greiffenberg *et al.*, 1997 und 1998; Guzman *et al.*, 1995). Aus diesem Grund dient die Listerieninfektion als Model für fakultativ intrazelluläre Bakterien. Nach dem Eindringen in die Wirtszelle befinden sich die Bakterien zunächst im Phagosom. Um sich der bakteriziden Eigenschaften des Phagosoms zu entziehen, lysiert das Bakterium die phagosomale Membran und gelangt somit in das Zytosol. Dort vermehren sich die *Listerien* und organisieren zur eigenen Fortbewegung einen zellulären Aktinschweif. Sie migrieren zur Zellperipherie, bilden dort pseudopodienartige Ausstülpungen in die angrenzende Zelle und breiten sich in der Nachbarschaft aus (Zusammenfassung: Kuhn und Goebel, 1995). Eine große Anzahl an Pathogenitätsfaktoren, die an diesem Infektionszyklus beteiligt sind, wurde bereits charakterisiert.

(Abb. 2)

2.3.3 LTA: Bestandteil der Zellwand Gram-positiver Bakterien

Die Zelloberfläche der Vertreter der Gattung *Listeria* ist aus verschiedenen Komponenten aufgebaut. Wie bei anderen Gram-positiven Bakterien kommen neben dem Peptidoglykan (Murein, Mucopепtid), Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren (LTA) vor (Fiedler, 1988). LTA ist ein amphiphiles Molekül; es besitzt sowohl hydrophobe als auch hydrophile Eigenschaften. Die Lipidregion verankert die Polymerkette mit der Außenseite der Zytoplasmamembran. Der hydrophile Anteil dringt in die bakterielle Zellwand ein. Auf diese Weise kann dieser Anteil als lose Komponente auf der Zelloberfläche als Antigen erkannt werden. Zusätzlich kann sich LTA von der Membran lösen (Wicken und Knox, 1977). LTA ähnelt dem Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien hinsichtlich biologischer

Eigenschaften, wie zum Beispiel die Aktivierung von Komplement und der Stimulierung einer unspezifischen Immunantwort (Wicken, 1980). Listerielle LTA stellt das einzige amphiphile Polymer auf der Oberfläche von *Listerien* dar (Uchikawa *et al.*, 1986), und besitzt somit als immunologisches Antigen eine entscheidende Rolle.

2.3.4 Internaline

Für die Invasion in unterschiedliche Zelltypen sind die zur Familie der Internaline (Engelbrecht *et al.*, 1996; Gaillard *et al.*, 1991) gehörenden Oberflächenproteine InIA und InIB (kodiert durch *inIA* und *inIB*) verantwortlich. **InIA** bindet an E-Cadherin, ein Adhäsionsmolekül welches an der basolateralen Seite von Epithelzellen gefunden wird. E-Cadherin ist somit an der Adhäsion und Aufnahme der Bakterien in Epithelzellen beteiligt (Mengaud *et al.*, 1996). **InIB** bindet an Met, ein Tyrosinkinase-Rezeptor. InIB vermittelt die Aufnahme von *L. monocytogenes* in eine Reihe von Zelltypen wie Hepatozyten, HEp-2 (humane, laryngeale, epitheliale Zelllinie), HeLa (humane, zervikale, epitheliale Zelllinie) und zerebrale Endothelzellen (Dramsi *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 1998; Greiffenberg *et al.*, 1998). Das listerielle Genom enthält noch weitere Internaline, wie *inIC* (Engelbrecht *et al.*, 1996), *inIC2*, *inID*, *inIE*, *inIF* (Dramsi *et al.*, 1997), und *inIG*, *inIH* und *inIE* (Raffelsbauer *et al.*, 1998), die häufig in Klustern lokalisiert sind. Internaline weisen eine typische Signalsequenz und eine „leucine-rich-repeat“ (LRR) Sequenz auf. LRR Proteine sind für eine Beteiligung an Protein-Protein Interaktionen bekannt (Kobe und Deisenhofen, 1994). Den einzelnen Internalinen scheint eine unterschiedlich starke Bedeutung bei der Adhäsion und Invasion verschiedener Zelltypen zuzukommen (Braun *et al.*, 1998). Dennoch ist die genaue Funktion und Regulation der meisten Internaline noch nicht bekannt (Dramsi *et al.*, 1997). **InIC** ist ein kleines, sekretiertes, PrfA abhängiges (siehe unten) Internalin. Obwohl ein *inIC* Deletionsmutante eine stark verminderte Virulenz im Maus-Tiermodell zeigt, wird nur ein geringer Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante bei Invasions- und Überlebensassays in Zellkulturexperimenten erkannt (Engelbrecht *et al.*, 1996).

2.3.5 p60 Protein

Das listerielle Oberflächenprotein **p60** (kodiert durch *iap*) ist ein sekretiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 60 kDa. p60 ist innerhalb der Mitglieder der Gattung *Listeria* stark konserviert (Bubert *et al.*, 1997). Kuhn und Goebel zeigten 1989, dass

es an der Aufnahme von *L. monocytogenes* in Säugerzellen beteiligt ist. Spontan auftretende Mutanten mit einer reduzierten Expression von p60 bilden in Kultur lange Ketten. Nach Zugabe von gereinigtem p60 erhalten die Bakterien ihre ursprüngliche Form zurück und zeigen eine dem Wildtyp vergleichbare Invasion. p60 besitzt eine Mureinhydrolase Aktivität und scheint an der listeriellen Zellteilung beteiligt zu sein (Wuenscher *et al.*, 1993). Immunologisch kommt dem Protein eine besondere Rolle zu. Epitope des sekretierten, listeriellen Proteins dienen sowohl CD4⁺ T-Zellen als auch zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen als Antigene. Der adoptive Transfer p60-spezifischer CD8⁺ T-Zellen kann im Mausmodell vor einer letalen Listerieninfektion schützen (Harty und Pamer, 1995). Geginat und Kollegen zeigten 1998, dass eine murine Infektion mit *L. monocytogenes* eine potente, p60-spezifische CD4⁺ Th1 Immunantwort auslöst. Diese Th1-Klone vermitteln einen signifikanten Schutz gegenüber einer Listerieninfektion. Interessanterweise kann eine Infektion mit dem apathogenen, häufig in der Umwelt vorkommenden *L. innocua* Stamm zum Verbleib von *L. monocytogenes* induzierten, p60-spezifischen Gedächtnis T-Zellen beitragen (Geginat *et al.*, 1999).

2.3.6 Das Virulenzgencluster

Nach dem Eindringen der *Listerien* in die Wirtszelle spielen Virulenzgene eine entscheidende Rolle für die zytoplasmatische Vermehrung und Ausbreitung der Bakterien. Diese Gene liegen in einem Virulenzgencluster auf dem listeriellen Chromosom. Dieses Cluster enthält die folgenden Gene: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB* (Portnoy *et al.*, 1992). Das Genprodukt von *prfA* stellt einen positiven Transkriptionsregulator für diese Gene dar (Leihmeister-Wächter *et al.*, 1990). Neben den Genen des Virulenzgenclusters werden auch Gene der Internalin-Genfamilie teilweise in Abhängigkeit von PrfA reguliert. Durch die PrfA-abhängige Regulation werden die Virulenzgenprodukte nur gebildet, wenn die *Listerien* sie tatsächlich benötigen (Bohne *et al.*, 1994).

Nach der Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle müssen sich die *Listerien* aus dem bakteriziden Milieu des Phagosoms ins Zytosol befreien. Die beiden Virulenzfaktoren Listeriolysin O und die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC), kodiert durch *hly* bzw. *plcA* sind an der Auflösung der phagosomalen Membran beteiligt. Bubert und Kollegen (1999) konnten nachweisen, dass die PrfA-abhängigen Promotoren von *hly* und *plcA* vorwiegend im Phagosomen aktiviert sind. Listeriolysin hat ein Molekulargewicht von 58-60 kDa und gehört zur

Gruppe der SH-aktivierbaren Zytolysine. Seine Aktivität liegt im sauren pH-Bereich (Geoffroy *et al.*, 1987; Goebel und Kreft, 1997). Nur den hämolytischen *Listerien* gelingt der Eintritt ins Zytosol und damit das Überleben und die Vermehrung (Kuhn *et al.*, 1988). *L. monocytogenes* repliziert sich im Zytosol. Mit Hilfe des **actA**-Genprodukts gelingt es *L. monocytogenes*, auf seiner Oberfläche Aktin der Wirtszelle zu polymerisieren. Dabei bildet sich der sogenannte Aktinschweif an einem Pol des Bakteriums aus, der intrazelluläre Fortbewegung von *L. monocytogenes* ermöglicht (Portnoy *et al.*, 1992). Nachdem sich die *Listerien* über pseudopodienartige Ausstülpungen in die Nachbarzelle ausgebreitet haben, sind die beiden Gene **plcB** und **mlp** für die Freisetzung der *Listerien* in der benachbarten Zelle verantwortlich. *plcB* kodiert für die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C, die durch eine Metalloprotease (kodiert durch *mlp*) posttranslational prozessiert wird (Domann *et al.*, 1991). Nach Auflösen der Membran in der benachbarten Zelle kommt es im Zytosol erneut zur Vermehrung der *Listerien* und zu deren weiteren Ausbreitung unter Umgehung des Extrazellularraums (Tilney und Portnoy, 1989). Die drei Gene *actA*, *plcB* und *mlp* sind ebenso wie *hly* und *plcA* PrfA reguliert. Im Unterschied zu diesen werden ihre Promotoren jedoch erst im Zytosol aktiv (Bubert *et al.*, 1999).

2.3.7 *L. monocytogenes* als Vektor für DNA-Vakzinierung

Unter DNA-Vakzinierung versteht man das Einbringen antigenkodierender Plasmid-DNA in den lebenden Organismus, welches sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort im Wirt induzieren kann (Hassett und Whitton, 1996). Im Hinblick auf DNA-Vakzinierungsstrategien ist *L. monocytogenes* als Vektororganismus aus mehreren Gründen von erheblicher Bedeutung: *Listerien* sind für eine orale Vakzinierung geeignet und können enteral von antigenpräsentierenden Zellen intrazellulär aufgenommen werden. Da *L. monocytogenes* die Fähigkeit besitzt, in das Zytosol der Wirtszelle einzudringen, können von rekombinanten *Listerien* sekretierte Proteine direkt in den MHC Klasse I- Präsentationsweg gelangen (Jensen *et al.*, 1997). Diese heterologen Antigene können somit zur Induktion CD8⁺ T-Zell vermittelter Immunantwort führen. Experimente mit viralen (Shen *et al.*, 1995) und tumoralen (Pan *et al.*, 1995), sekretierten, heterologen Antigenen wurden bereits erfolgreich durchgeführt.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Interaktion zwischen DZ und *L. monocytogenes* untersucht werden. Es soll geklärt werden, ob *L. monocytogenes* in DZ aufgenommen wird und welche Faktoren für die Aufnahme von Bedeutung sind. Weiterhin ist die Frage zu klären, ob es den *Listerien* nach Aufnahme gelingt, sich ins Zytosol der DZ zu befreien. Es ist von Bedeutung, welche Auswirkungen die Infektion auf den Reifezustand der DZ hat und ob sich der Phänotyp der Zellen hinsichtlich Expression von Oberflächenmarkern und morphologischen Charakteristika verändert. Schließlich soll untersucht werden, ob die Infektion mit *L. monocytogenes* von den DZ überlebt wird, bzw. Zelltodmechanismen wie Apoptose oder Nekrose zu beobachten sind.

Die Beantwortung dieser basalen Fragen zur Interaktion DZ mit *L. monocytogenes* ist im Hinblick auf neue Vakzinierungsstrategien mit *Listerien* als Träger für die DNA Vakzine von entscheidender Bedeutung. Durch die bei der Infektion hervorgerufenen, zellulären Veränderungen können wichtige Erkenntnisse darüber liefern, ob eine Vakzinierung von DZ mit *L. monocytogenes* erfolgversprechend ist, und wie ein zukünftiger Vakzinierungsvektor zu konstruieren ist.

3 Material

Alle nicht näher aufgeführten Chemikalien und Antibiotika wurden von den Firmen Bio-Rad, Ferak, Gibco BRL, Merck, Roth, Serva, Sigma und USB bezogen. Nährmedien und Agarose stammen von Difco (Augsburg), Gibco-BRL (Berlin) oder Merck (Darmstadt). Die für die Zellkultur verwendeten Medien und Antibiotika stammen von Gibco-BRL. Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien wird im Methodenteil beschrieben. Der *Cell death detection ELISA^{plus} Kit* stammt von Boehringer, Mannheim. Die listerielle Lipoteichonsäure (LTA) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Fiedler, Mikrobiologie München, zur Verfügung gestellt. Murine Knochenmarks-DZ wurden von Herrn Dr. Kämpgen, Universitätshautklinik Würzburg bereitgestellt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Krohne, Zell und Entwicklungsbiologie Würzburg durchgeführt.

3.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Vektor Eigenschaften	Resistenz	Quelle/Referenz
<i>L. monocytogenes</i>				
Sv 1/2a EGD	Wildtyp			Stammsammlung des Instituts
<i>L.m.</i> GFP P _{actA}	P _{actA} -gfp	exprimiert GFP unter der Kontrolle des <i>actA</i> -Promotors	Tetracyclin	Dietrich <i>et al.</i> , 1998
<i>L.m.</i> P _{CMV} GFP P _{actA} Ply118	p3LGFP118	exprimiert PLY118 unter der Kontrolle des <i>actA</i> -Promotors und GFP unter Kontrolle eines CMV Promotors	Tetracyclin	Dietrich <i>et al.</i> , 1998
10403S	Wildtyp			Jones und Portnoy, 1994
DP-L2161	Δhly	„In frame“ Deletion in <i>hly</i> , Isogen zu 10403S		Jones und Portnoy, 1994
<i>L.m.</i> Δiap	Δiap	„In frame“ Deletion in <i>iap</i> , Isogen zu Sv 1/2a		Pilgrim, Manuskript in Vorbereitung

Sv 1/2a EGD	<i>prfA</i> *	mutiertes <i>prfA</i> Allele von P14A	Erythromycin	Kolb-Mäurer <i>et al.</i> , eingereicht in Infect. Immun.
<i>L.m. Δiap</i>	<i>Δiap, prfA</i> *	mutiertes <i>prfA</i> Allele von P14A	Erythromycin	Kolb-Mäurer <i>et al.</i> , eingereicht in Infect. Immun.
WL-112	<i>ΔinlAB</i>	" In frame" Deletion in inlAB	Tetracyclin	Greiffenberg <i>et al.</i> , 1997
<i>L .innocua</i> Sv6a	P_{actA} -gfp	exprimiert GFP unter der Kontrolle des <i>actA</i> - Promotors	Tetracyclin	Stammsammlung des Instituts
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Wildtyp			J. Heesemann
<i>Escherichia coli</i> DH10b	Wildtyp			Stammsammlung des Instituts
<i>Salmonella LB 5000</i>	Wildtyp			Stammsammlung des Instituts
<i>Salmonella typhimurium</i> 14028S	Wildtyp			Libby <i>et al.</i> , 1994
<i>Shigella flexneri</i>	Wildtyp			Stammsammlung des Instituts

3.2 Vektoren und Plasmide

Name/Herkunft	Vektor	Resistenzmarker	Transkriptionseinheit
P_{actA} -gfp, Dietrich <i>et al.</i> , 1998	pcDNA3L	Tetracyclin	P_{actA} -gfp
<i>prfA</i> , J.A. Vasques-Boland	pHPS9	Erythromycin	mutiertes <i>prfA</i> Allel von P14-A
p3LGFP118, Dietrich <i>et al.</i> , 1998	pcDNA3L	Tetracyclin	P_{actA} -ply118; P_{CMV} -gfp

3.3 Lösungen, Puffer, Chemikalien

Puffer und Lösungen sind mit deionisiertem H₂O hergestellt, autoklaviert bzw. sterilfiltriert oder aus bereits sterilen Lösungen hergestellt.

Substanz/Firma	Zusammensetzung/Eigenschaften
Lymphoprep, Nycomed	Dichte 1,077 g/ml
Phosphat gepufferte Saline (PBS) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	8 g NaCl 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,2 g KCL 1,15 g Na ₂ HPO ₄ H ₂ Odest ad 1000 ml, pH 7.4
PBS-Heparin	5 U/ml Liquimin (Stock 5000 U/ml) in PBS
PBS-EDTA	1 mM EDTA (Stock 0,5 M EDTA, pH 8.0) in PBS
PBS-Citrat	0,0106 M Na-Citrat (Stock 0,106 M) in PBS
Tris gepufferte Saline (TBS)	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 150 mM NaCl
Lysis Puffer	7,72 g Ammoniumchlorid 0,79 g Ammoniumhydrogencarbonat 0,74 g KCl 0,037 g EDTA H ₂ Odest ad 1000 ml, pH 7.2
Alsever-Lösung	4,2 g NaCL 8 g Na-Citrat·2H ₂ O 0,55 g Citronensäure·H ₂ O 20,5 g D –Glucose H ₂ Odest ad 1000 ml, pH 6.1
Neuraminidase, Roche Diagnostik	gewonnen aus <i>Vibrio cholera</i>
Humanes Albumin	Bayerisches Rotes Kreuz
Hypotone, fluoreszierende Lösung (Nicholetti <i>et al.</i>)	50 µg/ml Propidium Iodid 0,1% Na-Citrat 0,1% Triton X-100
Laemmlipuffer	50 mM Tris-HCl pH 6.8 10% Glycerin 5% β-Mercaptoethanol 2% SDS, 0,05% Bromphenolblau

12,5%iges Trenngel (60 ml)	12 ml H ₂ Odest 22,5 ml 1 M Tris-HCl pH 8.8 0,6 ml 10% SDS 25 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 0,3 ml 10% APS 30 µl TEMED
4%iges Sammelgel (20 ml)	12,2 ml H ₂ Odest 5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6.8 0,2 ml 10% SDS 2,6 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 100 µl 10% APS 20 µl TEMED
Laufpuffer für Proteingele	14,4 g Glycin 3,03 g Tris-HCl 1,0g SDS H ₂ Odest ad 1000 ml
Anodenpuffer I	300 mM Tris-HCl 20% Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris-HCl 20% Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris-HCl 40 mM ε-Aminocarbonsäure
Entwickler für Meerrettichperoxidase	47 ml PBS 3 ml 0,3% 4-Chloronaphtol in Methanol 60 µl H ₂ O ₂
Karnovsky-Reagenz	5,4 ml Formaldehyd (4%ig) 10 ml Glutaraldehyd (25%ig) Cacodylatpuffer ad 50 ml
Cacodylatpuffer (0,2 M)	42,8 g Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat HCl (1 N) auf pH 7.2 H ₂ Odest ad 1000 ml
Cytochalasin D	Sigma, Stammlösung 0,5 mg in DMSO

3.4 Zytokine

Zytokin	Firma	Stammlösung
Rekombinantes, humanes Interleukin-4 (rhIL-4)	PBH Strathmann Biotech GMBH	100 U/ml in RPMI und 0,1 mg/ml HSA, -20°C
Rekombinanter, humaner Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (rhGM-CSF),	Leukomax, Sandoz	100 U/ml in RPMI und 0,1 mg/ml HSA, -20°C
Rekombinanter, humaner Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (rhM-CSF),	PBH Strathmann Biotech GMBH	100 U/ml in RPMI und 0,1 mg/ml HSA, -20°C
TNF- α	PBH Strathmann Biotech GMBH	1000 U/ml in RPMI und 0,1 mg/ml HSA, -20°C
IL1- β	PBH Strathmann Biotech GMBH	1000 U/ μ l in RPMI und 1 mg/ml HSA, -20°C
Prostaglandin E2 (PGE2)	Calbiochem	1mM in Ethanol, -20°C
IL-6	PBH Strahtmann Biotech GMBH	1000 U/ μ l in RPMI und 0,1 mg/ml HSA, -20°C

3.5 Monoklonaler Antikörper für die Durchflusszytometrie und Immunoblots

Antikörper	Klon	Herkunft
anti-HLA class II DR, murin	L243	American Type Culture Collection, Manassas, Va.
anti-HLA class II Dr/DQ murin	9.3F10	American Type Culture Collection, Manassas, Va.
anti-CD25, murin	MA251	Pharmingen, Hamburg
anti-CD83, murin	HB15a	Immunotech, Hamburg
anti-CD1a, murin	OKT6,	Rockville, MD, USA
anti-CD14, murin	M5E2	Pharmingen, Hamburg

anti-CD16, murin	3G8	Pharmingen, Hamburg
anti-CD32	FLI8.26, 2003	Pharmingen, Hamburg
anti-CD64	10.1	Pharmingen, Hamburg
anti-CD86, murin	IT2.2	Pharmingen, Hamburg
anti p60, murin	K3A7	Rowan <i>et al.</i> , 200
Kaninchen-anti-Maus Immunglobulin, Phycoerythrin-gekoppelt,		Dianova, Hamburg
Ziege-anti-human Immunglobulin (IgA+IgG+IgM, H+L), Peroxidase-gekoppelt		Dianova, Hamburg, Germany
Schwein-anti-Maus Immunglobulin Peroxidase-gekoppelt		DAKO, Elstrup, Denmark

3.6 Verbrauchsmaterial für Bakterien und Zellkultur

Alle verwendeten Materialien werden vor Gebrauch sterilisiert. Medien mit Agarzusatz und Flüssigmedien zur Bakterienkultur werden 20 min bei 120°C autoklaviert. Zur Herstellung der Agarplatten werden ca. 25 ml der handwarmen Lösung in Petrischalen ($\varnothing = 10$ cm) gegossen. Nach dem Erstarren und dem Trocknen können diese für maximal zwei Monate im Kühlraum gelagert werden. Steriles Einwegmaterial wie Einmalpipetten, Zellkulturplatten („Multi-Well“) und Petrischalen stammen von den Firmen Costar, Falcon, Greiner und Nunc.

3.7 Medien für die Bakterienkultur

BHI (Brain Heart Infusion) als Ausgangssubstanz für Flüssigmedium wird von Gibco-BRL (Berlin) bezogen. Zum Plattengießen hingegen wird BHI von Merck (Darmstadt) verwendet. Die Lösung in H₂O_{dest} wird autoklaviert. Für das Gießen von BHI-Platten wird der Lösung vor dem Autoklavieren 1,5% Agar hinzugefügt.

BHI-Medium:

BHI 37 g

H₂O_{dest} ad 1000 ml

BHI-Platten:

Agar 15 g

BHI-Medium ad 1000 ml

LB-Medium:

Bacto Yeast Extract 5 g/L

NaCl 5 g/l ad

H₂Odest ad 1000 ml

3.8 Geräte

Autoklaven

Begasungsbrutschrank

Brutschrank

Durchflusszytometer EPICS XL

ELISA Reader

Elektroblot-Apparatur

Elektrophoresekammern

Feinwaage

Grobwaagen

Inverses Mikroskop

Kamera

Klett Photometer

Kühlzentrifugen

Kritisch-Punkt Trocknungsanlage

Lichtmikroskop

Magnetrührer

Mikropipetten

Minifuge

pH-Meter

Photometer

Zeiss-Spektralphotometer

Rasterelektronenmikroskop

Transmissionselektronenmikroskop

Webeco

Nunc Cellstar

Heraeus

Beckmann-Coulter

Bio Rad

Biotec-Fischer

Mechanikwerkstatt des Instituts

Sartorius

Sartorius

Leitz Labovert, Olympus CK2

Vistron Micro Max, Puchheim

Klett

Heraeus

CPD 030; BAL-TEC

Leitz Dialux 20

Heidolph MR 1000

Gilson

Heraeus Sepatech Minifuge RF

WTW pH 523, Metrohm-Herisau

Klett-Summerson Photoelectric

Colorimeter

DM 4 und PM 6

Zeiss DSM 926

Zeiss EM10 at 80 kV

Rüttler	IKA-VIBRAX-VXR
Schüttelinkubator	Clim-O-Shake Braun-Melsungen, Infors AG
Speed Vac	Savant
Sterilbank	NuAire II Type A/B3, Heraeus Lamin Air HBB2448, Flo Gelaire Pharmacia LKB, Schweden
Szintillationscounter	Liebisch
Thermoblock	Eppendorf 5412 und 5412 C, Hettich Microliter
Tischzentrifuge	Neubauer
Zellzählkammer	Universal 16R
Zellkulturzentrifuge	

4 Methoden

4.1 Bakterienkultur

Die Bakterienstämme werden als Glyzerinstocks aufbewahrt. Dazu wird BHI-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht (ÜN) inkubiert. Der Bakterienkultur werden 30% (v/v) steriles Glyzerin zugesetzt und sie wird bei -70°C eingefroren. Für eine Zellinfektion werden die Bakterien aus der Glyzerinkultur nach Animpfen von BHI-Medium in einem KlettKolben unter Schütteln bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 160-180 Kletteinheiten (logarithmische Phase) inkubiert. Nach Abzentrifugieren (10 min, 6000 rpm, 4°C) werden die Bakterien zweimal mit PBS gewaschen. Das Bakterienpellet wird in 20% (v/v) Glyzerin in PBS resuspendiert, auf Eis aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Bevor diese Bakterien zur Infektion eingesetzt werden, wird die Lebendbakterienzellzahl durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen bestimmt.

4.2 Elektrotransformation

4.2.1 Herstellung elektrokompetenter *Salmonellen* und *Yersinien*

1 ml einer ÜN Bakterienkultur wird in 100 ml BHI-Medium angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,5-0,8 bei 37°C unter Schütteln herangezogen. Danach wird die Kultur 15-30 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation ($4000 \times g$, 15 min, 4°C) wird das Pellet in 100 ml 10% Glyzerin (eiskalt) resuspendiert und (s.o.) zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 50 ml Glyzerinwasser aufgenommen. Die Schritte wiederholen sich noch einmal in einem Volumen von 20 ml Glyzerinwasser, bis das Pellet schließlich in 1 ml 10% Glyzerin resuspendiert und zu 100 μl Portionen aliquotiert wird.

4.2.2 Elektrotransformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Zur Elektrotransformation werden 100 μl kompetente Bakterien mit 1 μg Plasmid-DNA gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgt in einer vorgekühlten Küvette mit 1,7 kV, 200 Ω und 25 μF . Anschließend werden 0,5 ml LB-Medium/ 0,5% Glucose/ 10mM MgSO_4 zupipettiert und die Bakterien 3 h bei 37°C zwischengezchtet und schließlich auf selektiven BHI-Platten ausplattiert.

Zur effektiven Transformation von Salmonellen muss das Plasmid zuerst in den Salmonellenstamm LB 5000 transformiert werden. Nach Isolierung des Plasmids aus diesem Stamm kann es nun in den gewünschten Salmonellenstamm transformiert werden.

4.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung erfolgt mit Hilfe des Nucleobond AX - Kits nach Anweisung des Herstellers (Macherey-Nagel). Die Ausbeute aus 10-100 ml Bakteriensuspension beträgt bis zu 100 µg Plasmid-DNA.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Generelle Hinweise zum Arbeiten mit DZ

DZ werden im Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37°C in RPMI 1640 Medium mit 1% autologem Plasma, 2 mM L-Glutamin, 1000 U/ml rekombinantes, humanes IL-4 (rhIL-4) und 800 U/ml rhGM-CSF kultiviert. DZ sind nicht adhärent. Die Zellen müssen daher vor jedem Mediumwechsel herunterzentrifugiert werden.

4.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Ausgangsmaterial zum Einfrieren ist eine Zellsuspension in Kompletmedium. Nach Auszählen der Zellen wird das Zellpellet im vorgekühlten Einfriermedium aufgenommen (90% FCS, 10% DMSO) und in einer Zelldichte von 1-2 x 10⁶ Zellen/ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Nach ÜN-Abkühlung in einem geschlossenen Styroporbehälter bei -70°C werden die Gefrieröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen werden die Gefrieröhrchen mit gelockertem Deckel kurz in ein 37°C-Wasserbad gehalten und die Zellsuspension aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften von DMSO zum Waschen in PBS aufgenommen.

4.3.3 Bestimmung der Bakterienlebendzellzahl mit Hilfe von Tryptanblau

Die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen gelingt mit Hilfe von Tryptanblau. Dieser Farbstoff kann nicht in Zellen mit intakter Membran eindringen und färbt somit nur tote Zellen blau. Von der Zellsuspension werden 20 µl mit dem gleichen Volumen an Tryptanblau vermischt und die farblosen, lebenden Zellen in einer Neubauerkammer ausgezählt. Dabei werden mindestens drei Großquadrate (bestehend aus 16 Kleinquadraten) ausgezählt. Über den Mittelwert ergibt sich die Lebendzellzahl pro ml wie folgt:

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = Z(F_f F_k)$$

Z = Lebende Zellen/Großquadrat

F_f = Verdünnungsfaktor (2)

F_k = Kammerfaktor (10000)

4.4 Kultivierung von humanen Mo-DZ aus peripherem Blut

Menschliche DZ können aus Monozyten des Blutes gewonnen werden (Romani *et al.*, 1996). Monozyten sind bipotente Vorläuferzellen, die je nach Kulturbedingung in Makrophagen oder DZ ausdifferenzieren können. Zur Gewinnung von Monozyten werden periphere, mononukleäre Blutzellen (PBMC) aus heparinisierten, Leukozyten-angereicherten *buffy-coats* von gesunden Spendern über Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dafür wird ein Gemisch aus Buffy-Blut und Heparin (5 U/ml)-PBS (1:2) auf einem Lymphoprep-Gradienten überschichtet und mit 200 x g 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Interphase wird in PBS-EDTA (1mM) aufgenommen und insgesamt 4x gewaschen. Die Zellen bestehen zu ca. 80% aus T bzw. B-Lymphozyten und zu ca. 20% aus Monozyten. Die PBMC werden in einer Dichte von 5 x 10⁶ Zellen/ml in RPMI 1640 Medium mit 2mM Glutamin, 1% autologem Plasma und 100 U/ml Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) für 45 min bei 37°C ausplattiert. Nichtadhärierende Lymphozyten werden anschließend mit warmen PBS weggespült. Die adhärierenden Zellen werden für 7 Tage in RPMI 1640 Medium mit 1% autologem Plasma, 2 mM L-Glutamin, 1000 U/ml rekombinantem, humanem IL-4 (rhIL-4) und 800 U/ml rhGM-CSF kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgt jeden 2.Tag. Im Unterschied zu Zelllinien vermehren sich Mo-DZ während der Kultivierung in der Regel nicht. Die Zellen sind nur begrenzt lebensfähig. Am 7. Tag entsprechen die Zellen mit ihren plumpen Ausläufern phänotypisch und funktionell unreifen DZ. Eine Differenzierung der Zellen zu reifen DZ gelingt unter anderem durch die Zugabe eines Zytokingemischs am 7. Tag. Dieses Gemisch enthält TNF-α (1000 U/ml), IL1-β (1000 U/ml), IL-6 (1000 U/ml) und Prostaglandin E₂ (10⁻⁸ M). Die Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration in der Zellkultur. Nach weiteren drei Tagen entsprechen die DZ sowohl hinsichtlich ihrer Morphologie als auch ihrer Funktion reifen DZ.

4.5 Kultivierung von humanen Makrophagen aus peripherem Blut

Die Kultivierung humaner Makrophagen ist bis auf die unterschiedliche Zytokinzugabe mit der Gewinnung von humanen Mo-DZ vergleichbar. Anstelle von IL-4 wird zur Gewinnung von Makrophagen dem RPMI-Medium 1% autologes Plasma, M-CSF (10 U/ml) und 100 U/ml GM-CSF zugesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgt alle 4 Tage.

4.6 Durchflusszytometrische-Analysen

Die Expression von Oberflächenmolekülen der DZ wird zu verschiedenen Zeitpunkten mit der Durchflusszytometrie analysiert. Dazu werden die Oberflächenmarker mit indirekter Immunfluoreszenz markiert. 100.000 DZ werden mit einem monoklonalen, murinen Antikörper (siehe Tabelle) gegen das zu analysierende Oberflächenmolekül für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen der nicht gebundenen Antikörper, werden die gebundenen Antikörper mit Phycoerythrin oder FITC konjugierten anti-Maus Immunglobulin gegen die FC-Region des primären Antikörpers markiert. Die Auswertung erfolgt mit dem EPICS XL-MCL Durchflusszytometer mit einem 488 nm Argonlaser. In Abhängigkeit vom Fluoreszenzfarbstoff wird der Filter mit der passenden Bandbreite ausgewählt.

4.7 Isolierung von T-Lymphozyten aus peripherem Blut mit Hilfe von Schafserythrozyten

T-Zellen binden über das CD2-Molekül an Schafserythrozyten und lassen sich mit dieser Methode aus dem Blut isolieren. Zur Gewinnung von Schafserythrozyten wird Schafsblut in Alsever-Lösung 1:1 verdünnt. Nach Zentrifugation wird das Erythrozytenpellet in PBS resuspendiert. Zur Entfernung von Glykosiden auf der Oberfläche der Schafserythrozyten wird 0,01 U/ml Neuraminidase zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Das Pellet wird schließlich in RPMI und 10% FCS aufgenommen.

Zur Isolierung von T-Lymphozyten werden 100×10^6 PBMC mit 1 ml Schafserythrozyten für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von PBS/Citrat wird das Zellgemisch mit einer Lymphoprep-Dichtegradientenzentrifugation (400 x g, 30 min, RT) aufgetrennt. Das T-Zell-Schafserythrozytenpellet wird zum Auflösen der Erythrozyten in Lysis Puffer aufgenommen. Nach Lysierung der Erythrozyten werden

die T-Zellen in PBS gewaschen, gezählt und in FCS/DMSO (40×10^6 Zellen/ml) eingefroren.

4.8 Gemischte Leukozytenreaktion (MLR)

Bei der MLR werden T-Lymphozyten durch die Zugabe von DZ unterschiedlicher Spender und somit inkompatiblen MHC Klasse II Antigenen stimuliert. Die T-Zell Proliferation kann durch Inkorporation von [^3H] Thymidin nachgewiesen werden. Das Ausmaß der Stimulierung hängt dabei vom Reifezustand der DZ ab.

In einer 96-Napf Mikrotiterplatte mit abgerundeten Boden werden die DZ in unterschiedlichen Zellzahlverhältnissen (zwischen 5000-500 DZ/ 100000 T-Lymphozyten) zu den T-Lymphozyten in einem Volumen von 200 μl gegeben. Nach fünftägiger Inkubation in RPMI-Medium und 10% FCS bei 37°C wird 25 μCi radioaktiv markiertes [^3H]Thymidin dazugegeben. 16 h später werden die Zellen auf Glasfiberfilter mit Hilfe eines 96-Napf Betaplate Harvester geerntet. Der radioaktive Einbau wird mit einem Szintillationscounter quantifiziert (Pharmacia-LKB, Uppsala, Schweden).

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardabweichungen pro Minute aus vier unabhängigen Kulturen angegeben.

4.9 Infektion DZ mit Bakterien

Die DZ werden am 7. Kulturtag gesammelt und mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl werden die DZ auf 24-Napf Schale in einer Dichte von 500.000 Zellen/ml in RPMI-Medium verteilt. Für die Untersuchung von Plasmafaktoren, die einen Einfluss auf die Aufnahme von Bakterien in DZ haben, werden den verschiedenen Zellkulturansätzen die entsprechenden Faktoren zugesetzt. Die DZ werden mit den bis zur logarithmischen Phase gewachsenen Bakterien aus einer Glycerinkultur infiziert. Die Bakterien werden in unterschiedlichen Bakterien/Zell Verhältnissen (MOI= Multiplizität der Infektion) zur Zellkultur pipettiert. Die Kultur wird nun für 1 h bei 37°C inkubiert, um den Bakterien den Eintritt in die Zelle zu ermöglichen. Um eine effiziente Infektion zu erreichen, reicht bei DZ die reine Sedimentation vollkommen aus.

Zur selektiven Entfernung der extrazellulären Bakterien werden die Zellen mehrfach gewaschen, adhärenente Bakterien werden durch die Zugabe von Gentamycin (100 $\mu\text{g/ml}$) in die Kultur abgetötet. Definitionsgemäß ist $t = 0$ der Zeitpunkt der Zugabe des Gentamycin-haltigem Mediums. Diese sogenannte Post-Infektionszeit (p.i.) findet

immer im Kulturmedium mit Plasma statt. Der Nachweis intrazellulärer Bakterien gelingt mit unterschiedlichen Methoden. Dabei erfassen die Bestimmungen der Lebendbakterienzahl und der Nachweis von intrazellulär, GFP-exprimierende Bakterien nur die lebendigen, wohingegen die Beurteilung mit der Lichtmikroskopie nach Giemsa-Färbung und der Elektronenmikroskopie auch die intrazellulär abgetöteten Bakterien erfasst.

4.9.1 Aufnahmehemmung

Um eine Aufnahme der Bakterien in DZ zu blockieren, wurden entweder 5 mg/ml Hefe-Mannan (Sigma), ein kompetitiver Antagonist zum Mannoserezeptor oder 2 µg/ml Cytochalasin D (hemmt die Aktinpolymerisation) 30 min vor und während der Infektion dazugegeben.

Blockierende anti-CD16 Antikörper (anti-FCγRIII) werden eingesetzt, um eine FCγRIII-vermittelte Phagozytose zu verhindern.

4.9.2 Präadsorption von humanen Immunglobulinen

Humane Immunglobuline werden mit 10^{10} *L. monocytogenes* für 12 h bei 4°C inkubiert. Die präadsorbierten Immunglobuline werden bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert und zum Infektionsmedium dazugegeben.

4.10 Detektion intrazellulär aufgenommener Bakterien

4.10.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Detektion intrazellulärer *Listerien* in DZ dient ein *L. monocytogenes* Stamm, der ein grün fluoreszierendes Protein (GFP)-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle eines *actA*-Promotors trägt. Dieses Konstrukt beschränkt die Expression von *gfp* auf *L. monocytogenes* Organismen, die sich aus dem Phagosom befreit haben. Die grün fluoreszierenden *Listerien* werden mit einem Fluoreszenz-Phasenkontrast Mikroskop nachgewiesen. Die Dokumentation erfolgt mit einer digitalen Bildsystem Kamera (Visitron, Puchheim). Die Nachbearbeitung wird mit der MetaMorph Imaging Software durchgeführt.

4.10.2 Giemsa-Färbung

Giemsa färbt sowohl eukaryontische Zellen als auch Bakterien, so dass eine Beurteilung der intrazellulären Aufnahme von Bakterien in DZ in qualitativer und

quantitativer Hinsicht möglich ist. Lichtmikroskopisch stellen sich die Bakterien nach Giemsa-Färbung dunkelblau bis schwarz gefärbt dar und sind somit deutlich von den zellulären, violett-rosa farbenen Strukturen zu unterscheiden. Eine Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien ist nicht möglich, eine Differenzierung von intra- und extrazellulären Bakterien ist bedingt möglich. Infizierte DZ werden mit einer Zytospinzentrifuge auf Objektträger gebracht. Nach dem Trocknen erfolgt die Fixierung mit 100% Methanol für 5 min und erneutes Trocknen an der Luft. Anschließend werden die Zellen für 20 min in verdünnter Giemsa-Lösung (1:20) gefärbt und danach mehrmals mit H₂Odest gespült. Die trockenen Präparate werden mit dem Lichtmikroskop (100x Ölimmersionsobjektiv) photographiert und ausgewertet. Die quantitativen Analysen intrazellulärer Bakterien werden lichtmikroskopisch nach Giemsa-Färbung im Anschluss an die einstündige Inkubation durchgeführt. Der Untersucher ist bei der Auszählung der Giemsa-Präparate geblindet. Zuerst wird der Anteil an infizierten Zellen bestimmt. Dafür werden 3-mal 100 DZ beurteilt. Anschließend wird die Zahl an intrazellulären *Listerien* in 100 DZ bestimmt. Aus der Mehrfachzählung ergibt sich der Mittelwert und die Standardabweichung.

4.10.3 Bestimmung der intrazellulären Lebendbakterienzahl (CFU)

Zur Bestimmung der aufgenommenen Bakterien und ihres intrazellulären Wachstumsverhaltens wird die CFU ermittelt. Dafür werden die infizierten DZ zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert, indem sie 15 min in H₂Odest (eiskalt) inkubiert werden. Die CFU wird durch Ausplattieren von Verdünnungsstufen auf BHI-Platten bestimmt. Aus der Anzahl der über Nacht gewachsenen Kolonien kann auf die Zahl der lebenden Bakterien im Lysat geschlossen werden. Da sich die *Listerien* vor der Lyse in den Zellen befanden und erst durch die Lyse freigeworden sind, lässt sich auf diese Weise die Invasionsrate bestimmen.

4.10.4 Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der intrazellulären Bakterienanzahl

Zur Untersuchung und Quantifizierung der intrazellulären Bakterienanzahl über einen längeren Zeitraum werden die Zellen nach der Infektion für weitere 1-24 Stunden in Kompletmedium mit Gentamycin (20 µg/ml) inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wird die CFU bestimmt. Mit dieser Methode wird eine intrazelluläre Vermehrung oder das Abtöten der Bakterien in Wirtszellen erfasst.

4.10.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die TEM werden die DZ auf runde Deckgläschen ($\varnothing = 1,2 \text{ cm}$) ausgesät. Nach der Infektion werden folgende Arbeitsschritte (Schritte 1-7) durchgeführt:

Die infizierten Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen.

Fixierung mit kaltem Karnovsky-Reagenz (in Cacodylatpuffer) für 30 min bei 4°C .

Das Präparat wird 3x in Cacodylatpuffer gewaschen.

Der Cacodylatpuffer wird abgesaugt und durch 2%iges Osmiumtetroxid ersetzt (halbkonzentriert in Cacodylatpuffer). Inkubation für 1 Stunde bei 4°C .

2x waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ (4°C).

0,5%ige Uranylazetat-Lösung (ÜN, 4°C).

2x waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$.

Die Entwässerung erfolgt in aufsteigender Ethanolreihe (je 5 min, 50%, 70%, 90%, 96% EtOH, bei 4°C ; 2x 5 min 100% EtOH, RT) und mit Propylenoxid (2 x 5 min, RT).

Die Präparate werden anschließend in Epon (812, Serva, Heidelberg)/Propylenoxid (1:1) im offenen Gefäß für 2-4 h bei RT gelagert. Anschließend werden die Präparate in Epon ÜN aufbewahrt. Für die Einbettung werden die Deckgläschen auf einen mit Aluminiumfolie umwickelten Objektträger gelegt und mit einer Gelatine kapsel, die mit frischem Epon gefüllt ist, bedeckt. Die Einbettungsformen werden für 48 Stunden bei 60°C polymerisiert. Die in Epon eingebackenen Präparate werden mit einem Skalpell freigelegt. Mit Hilfe von Semidünnschnitten ($1-2 \mu\text{m}$) wird eine geeignete Stelle ausgesucht. Die Ultradünnschnitte (60-80 nm) werden auf Kupfernetze aufgezogen.

4.10.6 Raster-Elektronenmikroskopie (Raster-EM)

Die Raster-EM ermöglicht die Beurteilung der Adhärenz von Bakterien an DZ, jedoch nicht deren Aufnahme. Die ersten Schritte entsprechen denen der TEM. Die Entwässerung erfolgt in aufsteigender Acetonreihe: je 10 min 30%, 50%, 75%, 90% Aceton; 5x 10 min 100% Aceton. Anschließend werden die Präparate getrocknet. Mit doppelseitig klebendem Band werden die Deckgläschen einzeln auf Objektische befestigt. Die Präparate werden mit einer 30 nm dicken Gold/Palladiumschicht bedampft.

4.11 Bestimmung der Adhärenz von Bakterien an DZ

Wird im Infektionsexperiment auf die Post-Infektionszeit in Gentamycin-haltigem Medium verzichtet und dadurch die extrazellulären Bakterien nicht abgetötet,

befinden sich nach der Lyse der Zellen im Zell-Lysat sowohl an DZ gebundene als auch von DZ aufgenommene Bakterien. Um allerdings nur die Adhärenz von Bakterien auf der Oberfläche von DZ zu überprüfen, muss die intrazelluläre Aufnahme der Bakterien blockiert werden. Dies gelingt entweder durch die Zugabe eines Aufnahmeinhibitors wie Cytochalasin D (2µg/ml) oder durch die Durchführung der Infektion bei 4°C. Cytochalasin D hemmt die zur Phagozytose essentielle Aktinpolymerisation der Wirtszelle. Um sicherzustellen, dass der Inhibitor die Aufnahme der Bakterien in die DZ schon zu Infektionsbeginn effektiv hemmt, werden die Zellen für 45 min mit dem Inhibitor präinkubiert. Die sich anschließende Infektion findet ebenfalls in Anwesenheit von Cytochalasin D statt. Nach einstündiger Infektion werden die nicht-adhärenzenden Bakterien durch 5maliges Waschen entfernt. Die adhärenzenden Bakterien können nach Lyse der Zellen durch die Bestimmung der CFU ermittelt werden.

4.12 Untersuchung von apoptotischen und nekrotischen Zelltod

Es existieren unterschiedliche Methoden zum Nachweis von apoptotischen und nekrotischen Zelltod. Um eine Apoptose bzw. Nekrose sicher beurteilen zu können, sollten immer mehrere Nachweisverfahren angewandt werden, die nur in der Zusammenschau aller Untersuchungen interpretiert werden sollten.

4.12.1 Beurteilung des apoptotischen/nekrotischen Zelltods über die Zellmorphologie

Die Lichtmikroskopie stellt eine schnelle und quantitative Methode dar, um Apoptose in einer Zellkultur zu quantifizieren. Zur besseren Darstellung des Nukleus werden die Zellen mit dem Kernfarbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33342; 5 µg/ml, 37°C, 15 min) angefärbt. Die Zugabe des Kernfarbstoffs erfolgt direkt in das Zellkulturmedium. Mit der Darstellung des Zellkerns lassen sich apoptotische Veränderungen wie die Chromatinkondensierung beurteilen. Zusätzlich können mit Hilfe von Vitalfarbstoffen wie Propidiumiod (1 µg/ml, 2 min) lebendige Zellen von Toten differenziert werden, was jedoch keine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zelltod zulässt, da auch apoptotische Zellen im spätem Stadium keine intakte Zellmembran mehr besitzen. Die Elektronenmikroskopie erlaubt eine genaue morphologische Aussage über apoptotische Veränderungen. Eine quantitative Beurteilung ist mit der EM jedoch schwierig.

4.12.2 Beurteilung des hypodiploiden, apoptotischen Zellkerns mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich quantitative Aussagen über die Prozentzahl an apoptotischen Kernen nach Propidium Iodid (PI) Färbung in einem hypotonem Puffer schnell und einfach treffen (Nicoletti *et. al.*, 1991). Apoptotische Kerne erscheinen dabei als breite, hypodiploide Spitze, und unterscheiden sich von dem schmalen Spitze der diploiden, normalen DNA. Das Zellpellet der infizierten DZ wird nach Zentrifugation bei 200 x g in 1,5 ml einer hypotonen, fluoreszierenden Lösung ÜN bei 4°C inkubiert. Die Beurteilung der angefärbten Kerne erfolgt mit der Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie wird mit einen 488 nm Argonlaser durchgeführt, die PI Fluoreszenz wird über einen 575 nm Diskriminator Filter gemessen. Um eine quantitative Aussage über apoptotische Zellkerne korrekt treffen zu können, muss die gewählten Einstellungen am Durchflusszytometer streng eingehalten werden.

4.12.3 Nachweis von apoptotischen DNA Fragmenten

4.12.3.1 Qualitativer Nachweis mittels Gelelektrophorese

Die durch Apoptose ausgelöste charakteristische DNA-Fragmentierung, bei der im Unterschied zur Nekrose DNA-Fragmente einer definierten Basenlänge entstehen, kann nach DNA-Aufreinigung und deren elektrophoretischen Trennung mit Hilfe eines Agarosegels nachgewiesen werden. Zur Gewinnung von chromosomaler DNA aus 5×10^6 DZ werden diese Zellen in DNAzol Puffer (200 µl; Gibco-BRL) aufgenommen. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 10000 x g wird die DNA im Lysat durch Fällung mit 100% Ethanol (100 µl) gewonnen. Anschließend wird die ausgefallene DNA zweimal mit 95% Ethanol gewaschen und in 8 mM NaOH gelöst. Die DNA wird nun auf ein 1% Agarosegel (in TAE-Puffer) aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit 200 V durchgeführt. Mit Ethidiumbromid (EtBr, 3 µg/ml) werden die DNA-Doppelstränge unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die fluoreszierenden Banden können mit einer Kamera aufgenommen und mit einem Thermoprinter ausgedruckt.

4.12.3.2 Quantitativer Nachweis mittels cell death detection ELISA^{plus}

Histon-assoziierten DNA-Fragmente lassen sich quantitativ mit Hilfe eines Enzymgebundenen Immunoassays, bei dem monoklonale Antikörper gegen diese

Fragmente eingesetzt werden, bestimmen (cell death detection ELISA^{plus}, Boehringer Mannheim). Die eingesetzten Maus-Antikörper richten sich sowohl gegen DNA (Anti-DNA-POD; Peroxidase konjugiert) als auch gegen Histone (Anti-Histon; Biotin konjugiert). Zur Durchführung dieses Tests werden 10^5 DZ in 96-Napf Platten infiziert (Infektion wie oben beschrieben). Nach verschiedenen Zeitpunkten p.i. wird der Zellüberstand und das Zellpellet abgenommen. Die weitere Bearbeitung erfolgt nach Angaben des Herstellers. Die im Zellüberstand gemessenen Werte entsprechen dem nekrotischen Anteil am Zelltod, wohingegen die Messungen der DNA-Fragmente und Histonkomplexe aus den Zellysaten mit der Apoptose korrelieren.

4.13 Immunoblots

Mit dem Immunoblot werden Bakterien-spezifischen Antikörper im Plasma von Spendern nachgewiesen. Dazu müssen primär Proteine aus bakteriellen Kulturüberstand und Bakterienzell-Lysat gewonnen werden.

Aus einer ÜN Bakterienkultur werden die Bakterien abzentrifugiert. Dem Überstand wird Trichloressigsäure in einer Endkonzentration von 10% zugesetzt. Die Lösung wird für 1 h auf Eis inkubiert. Die somit gefällten Proteine werden 30 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Proteinpellet wird mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen, und anschließend in Laemmlipuffer gelöst (je 10 ml Überstand in 100 ml Laemmlipuffer). Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel werden die Proben 5 min bei 100°C denaturiert.

Zur Gewinnung von Protein aus Bakterien wird das Bakterienpellet aus einer 300 µl einer ÜN-Kultur in 150 µl Laemmlipuffer resuspendiert. Zur Entfernung der DNA wird das Zell-Lysat mit 1 Unit Benzonase (Merck) 15 min bei 37°C inkubiert.

Für die Auftrennung der bakteriellen Proteine werden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Diese Gele bestehen aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Die Proteine werden bei 200 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wird ein *broad range* Marker der Firma Bio-Rad verwendet. Der Transfer der Proteine vom SDS Gel auf Nitrozellulose (HybondTM-C, Amersham) erfolgt nach der *Semidry Electroblothing* Methode. Die beiden Graphitplatten der Elektroblo-Kammer werden mit H₂Odest angefeuchtet. Auf die untere Anoden-Platte werden die folgenden Lagen luftblasenfrei geschichtet:

6 x in Anodendepuffer I getränktes Whatman-Papier

3 x in Anodendepuffer II getränktes Whatman-Papier

Nitrozellulosemembran, mit H₂Odest angefeuchtet

Polyacrylamidgel

6 x in Kathodenpuffer getränktes Whatman-Papier

Nach Aufsetzen der oberen Graphitplatte (Kathode) werden die Proteine für 90 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche transferiert.

Die geblohteten, bakteriellen Zelloberfläche- und Überstandsproteine dienen nun zum Nachweis von spezifischen bakteriellen Antikörpern im Plasma bzw. Serum. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die Nitrozellulosemembran für 1 h bei 37°C in 2% Bovinen Serum Albumin in TBS geschwenkt. Nach Trennung der Filterspuren werden sie einzeln mit den Spenderplasmen und Seren (1:200 verdünnt) und monoklonalen Antikörper (positiv Kontrolle) ÜN inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Immunglobuline gelingt mit sekundären Meerrettichperoxidase-konjugierten Schwein-anti-Maus (1:1000 verdünnt) und Ziege-anti-human Antikörper (1:2000 verdünnt). Als Substrat der Peroxidase dient 4-Chloro-1-Naphthol (0,02% w/v).

4.14 Statistik

Alle Experimente erfolgen im Dreifachansatz in 24er Napfplatten. Angegeben werden Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgt mit den ungepaarten Student-t-Test, als signifikant werden p-Werte < 0,01 angesehen. Für die Auswertung wird das Programm Statistica (Vers. 5.1) verwendet.

4.14.1 Standardabweichung

Die in den Graphen angegebenen Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichung der einzelnen Messwerte.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung von Mo-DZ

Humane, Monozyten-generierte (Mo)-DZ wurden aus Blutmonozyten nach siebentägiger Kultivierung in RPMI Medium mit dem Zusatz von 1% autologem Plasma, GM-CSF und IL-4 gewonnen. Vor der Durchführung der Infektionsexperimente wurden die DZ auf ihre Qualität und Reinheit überprüft. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass zwischen 85 und 90% der Zellen die charakteristischen Oberflächenmoleküle für unreife DZ wie CD1a und MHC Klasse II exprimieren (Abb. 3).

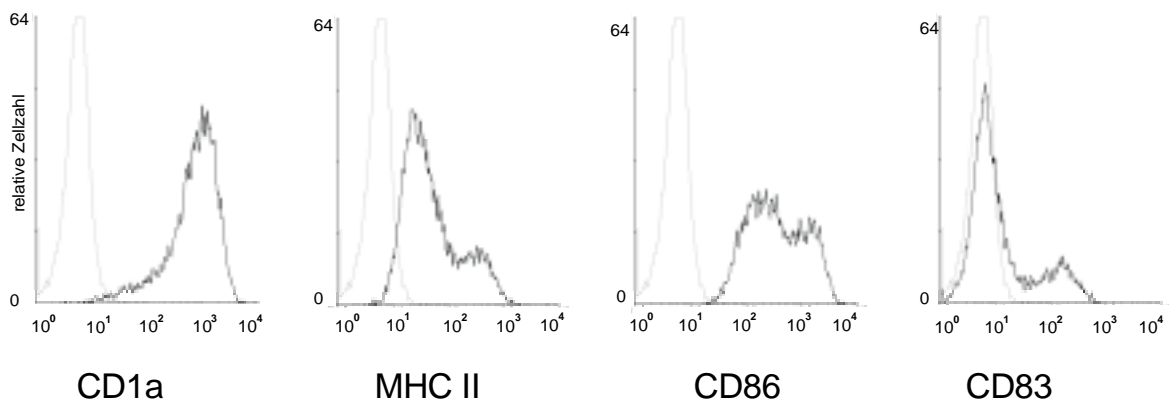


Abb. 3

Durchflusszytometrie der Oberflächenmarkerexpression von CD1a, MHC Klasse II, CD86 und CD83 auf unreifen, humanen Mo-DZ (7 Tage in Kultur). Die x-Achse zeigt die logarithmisch dargestellte Fluoreszenzintensität; die y-Achse die relative Zellzahl. Graue Histogramme repräsentieren die zugehörigen Isotypantikörper.

CD14, als Marker für Makrophagen/Monozyten wurden nicht auf den gewonnenen Zellen nachgewiesen. Die Expression des dendritischen Reifemarkers CD83 lag durchschnittlich bei 15% (Abb. 3). Die noch unreifen DZ sind durch hohe Phagozytosekapazität gekennzeichnet. Dies konnte durch Inkubation mit gelb-grün fluoreszierenden Kügelchen (1 μ m, Extinktion/Emission 505/515, Eugene) gezeigt werden, wobei 10 mal mehr Kügelchen als Zellen eingesetzt wurden. Bereits nach 1

Stunde hatte die Mehrheit der DZ diese sogenannten „beads“ aufgenommen (Abb. 4).

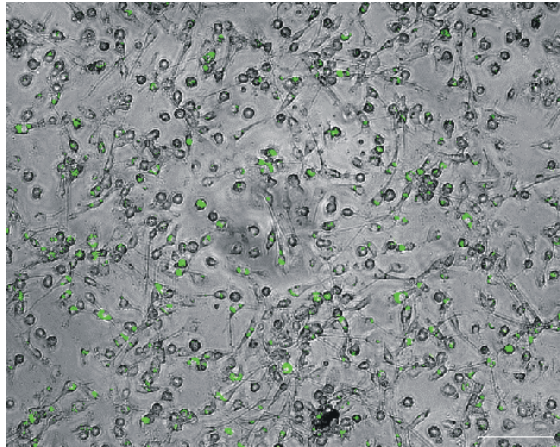


Abb. 4

Überprüfung der Phagozytosekapazität unreifer DZ 1 h. nach Zugabe von FITC-markierten Kügelchen (Durchmesser 0,1 μm ; Balkenlänge 100 μm).

5.2 Humane Mo-DZ phagozytieren *L. monocytogenes*

Listerien können in viele eukaryontische Zell-Typen eindringen. Interaktionen zwischen humanen DZ und *Listerien* sind jedoch noch nicht beschrieben worden.

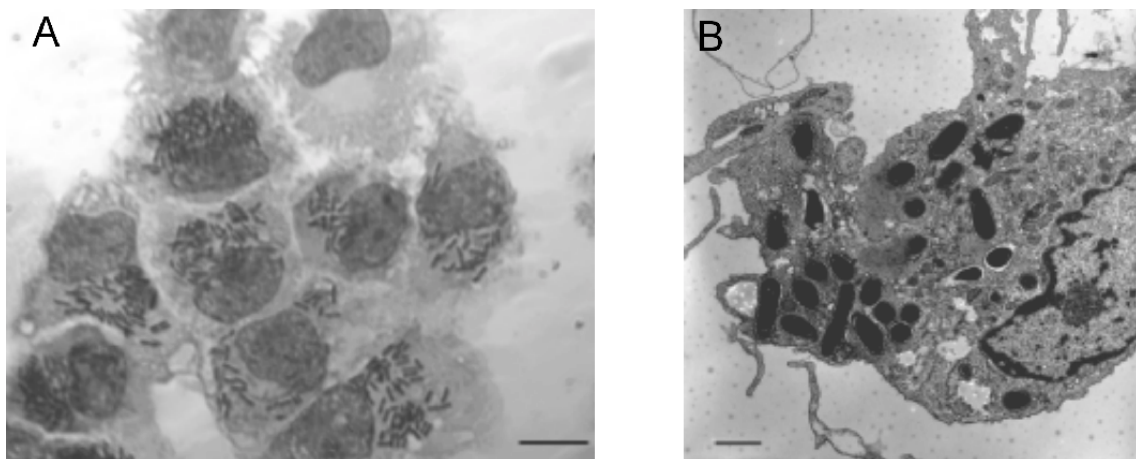


Abb. 5

Phagozytose von *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ 30 min p.i.:

A. Lichtmikroskopie nach Giemsa-Färbung (Balkenlänge 10 μm)

B. TEM (Balkenlänge 1,1 μm)

Daher wurde initial untersucht, ob *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ eindringt. Die bakterielle Aufnahme wurde mit unterschiedlichen Nachweismethoden wie Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Mikroskopie nach Giemsa-Färbung, Bestimmung der Lebendbakterienzahl (CFU) und listerielle GFP Expression in der Wirtszelle analysiert. Unreife Mo-DZ und *Listerien* wurden mit MOI zwischen 10-100 in der Anwesenheit von autologem Plasma inkubiert.

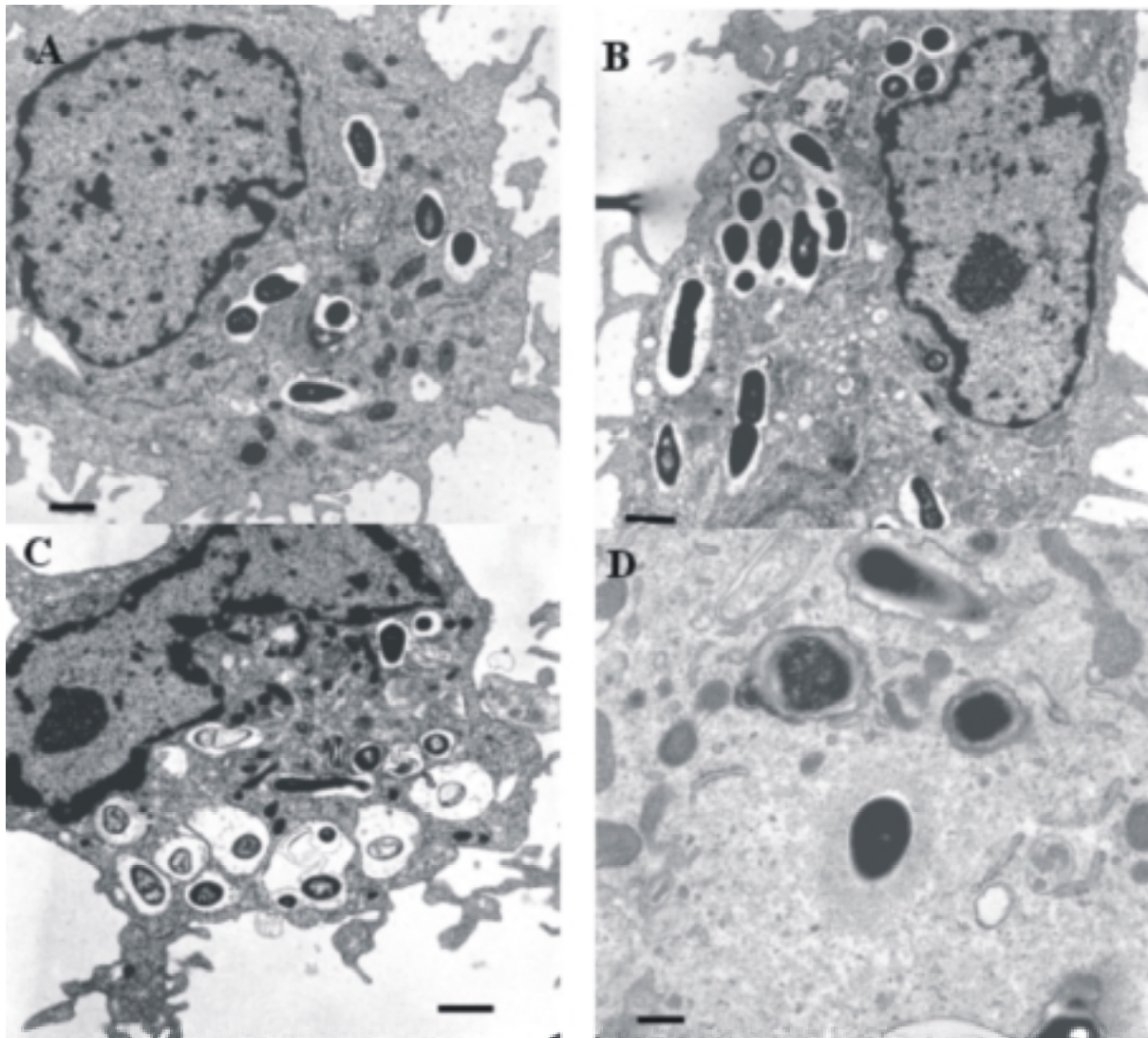


Abb. 6

A. 1,5 h nach Inkubation DZ mit *L. monocytogenes* EGD (MOI 50), befinden sich die meisten Bakterien in Membran-umschlossen, phagosomalen Organellen (Balkenlänge 1,1 μm)

B. C. 3 h (B) und 6 h (C) p.i. befindet sich die Mehrheit der *Listerien* innerhalb der Phagosomen, die zum Teil zu großen Vakuolen verschmelzen (Balkenlänge 1,1 μm).

D. TEM-Aufnahme 30 min p.i. eines zytoplasmatischen Bakteriums, das bereits mit der Aktinpolymerisation begonnen hat (Balkenlänge 0,4 μm).

5.2.1 Nachweis von intrazellulären *L. monocytogenes* mittels TEM und Lichtmikroskopie nach Giemsa-Färbung

Mit der Lichtmikroskopie nach Giemsa-Färbung konnte gezeigt werden, dass bei MOIs zwischen 10 und 100 über 80% der DZ 30 min p.i. mit *Listerien* infiziert waren (Abb. 5). Der Prozentsatz an unreifen DZ in der Gesamtzellpopulation entsprach, wie oben erwähnt, durchschnittlich 80% - 90%. Das bedeutet, dass praktisch jede unreife Mo-DZ *L. monocytogenes* aufnimmt. Die Anzahl an phagozytierten Bakterien pro DZ variierte zwischen 1-50 und war eindeutig abhängig von der eingesetzten MOI. Bei einer MOI von 10 enthielten die DZ durchschnittlich weniger Bakterien als bei einer höher gewählten MOI. Nach Infektion mit einer MOI von 50 befanden sich durchschnittlich 30 Bakterien pro Zelle. Die TEM zeigte, dass sich die *Listerien* nach Phagozytose hauptsächlich innerhalb Membran-gebundener Phagosomen befanden (Abb. 6 A). Zu diesem Zeitpunkt enthielt die Mehrheit der Phagosomen jeweils nur ein Bakterium. In wenigen DZ zeigten sich zytosolische *L. monocytogenes*, die bereits mit der Polymerisation von Wirtszell-Aktin begonnen hatten (Abb. 6 D).

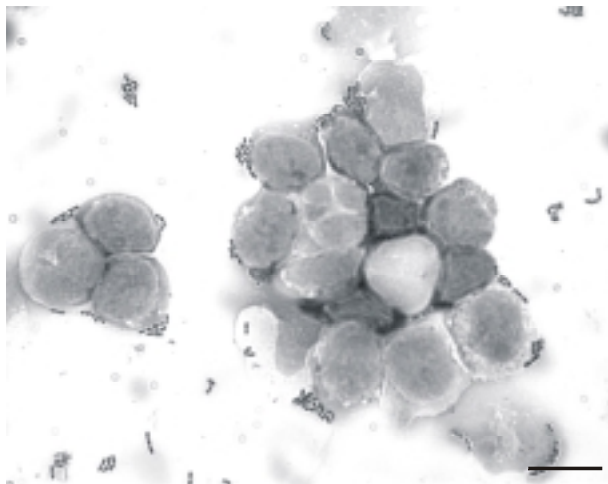


Abb. 7

T-Lymphozyten lassen sich nicht mit *L. monocytogenes* EGD infizieren (MOI 50). Nach Giemsa-Färbung ist lediglich eine Adhäsion der Bakterien an die T-Lymphozyten zu beobachten (Balkenlänge 10 µm).

Nach 3 h und 6 h p.i. befanden sich die *Listerien* noch im Phagosom. (Abb. 6 B, C). Gelegentlich wurde eine Fusion der einzelnen Phagosomen zu großen Vakuolen beobachtet.

Im Unterschied zur effektiven Phagozytose von *L. monocytogenes* in humane DZ wurden T-Lymphozyten, die bedingt durch die Kulturvierungsmethode Mo-DZ zu

einem geringen Teil (< 10%) verunreinigen, nicht infiziert. *L. monocytogenes* adhärten zwar an T-Zellen, eine Aufnahme in diese Zellen konnte jedoch mit Hilfe der Lichtmikroskopie nach Giemsa-Färbung niemals beobachtet werden (Abb.7).

5.2.2 Nachweis zytosolischer *L. monocytogenes* mit GFP-exprimierenden

Bakterienstamm

Nach dem Einsatz des GFP exprimierenden Listerienstamms *L. monocytogenes* P_{actA}-*gfp* konnten frühestens 4 h p.i. *Listerien* in bis zu 5% der infizierten DZ mit der Phasen-Kontrast/Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Abb. 8). Der *actA*-Promotor wird erst nach dem Eindringen von *L. monocytogenes* ins Zytosol aktiviert. Da dieser Bakterienstamm GFP unter der Kontrolle des *actA*-Promotors exprimiert, müssen die fluoreszierenden Bakterien im Zytosol lokalisiert sein.

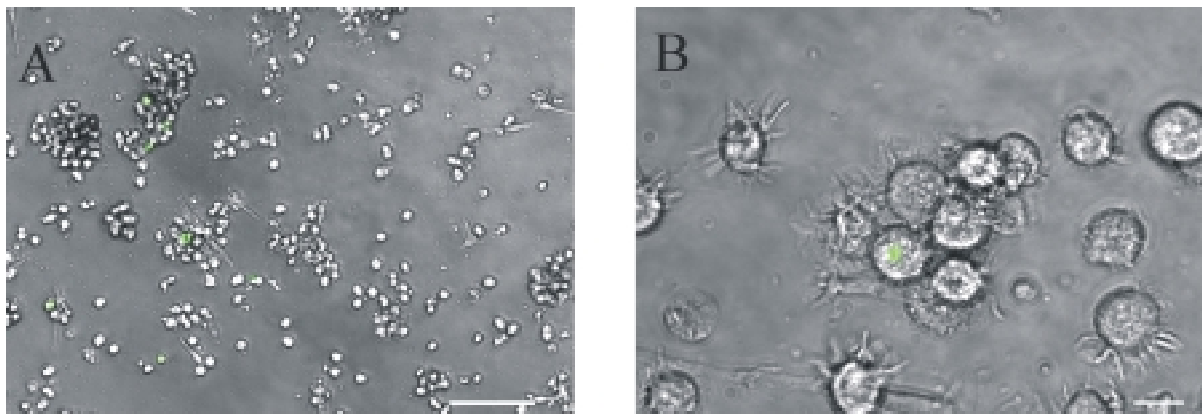


Abb. 8

A. Nachweis von zytosomatischen *L. monocytogenes* in humanen Mo-DZ mit Hilfe eines *L. monocytogenes* Stamm, der GFP unter der transkriptionalen Kontrolle von *actA*-Promotor exprimiert (12h p.i., MOI 50; Balkenlänge 100 µm).

B. Die infizierten DZ zeigen morphologische Veränderungen, die für reife DZ charakteristisch sind (24h p.i., MOI 50; Balkenlänge 10 µm). Es sind wenige, fluoreszierende *Listerien* zu beobachten.

Dieses Ergebnis stimmte mit den Beobachtungen der TEM überein, hier fanden sich nur in wenigen Zellen zytosolische *Listerien*. Nach Infektion humaner Monozytengenerierter (Mo)-Makrophagen am 8. Tag der Kultivierung mit *L. monocytogenes* P_{actA}-*gfp*, wurden in weniger als 1% der Zellen fluoreszierende Bakterien nachgewiesen (Abb. 9).

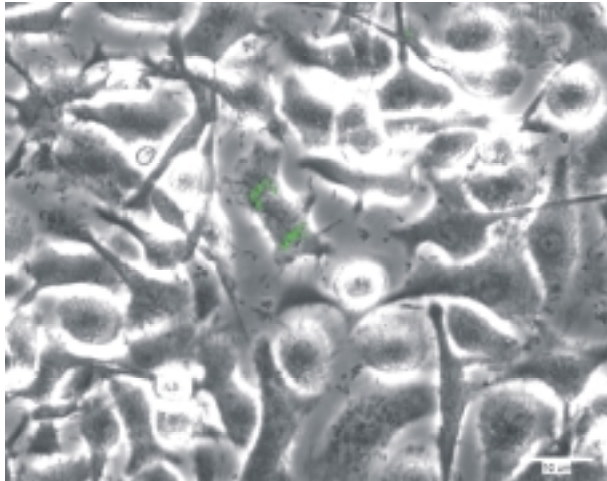


Abb. 9

Infektion von Mo-Makrophagen mit *L. monocytogenes* P_{actA} gfp (MOI 50; 12 h p.i.; Balkenlänge 10 µm). Nachweis von zytosolischen *Listerien* mit intrazellulärer Replikation (keine Fluoreszenz extrazellulärer Bakterien).

Mit der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die intrazelluläre *Listerien* enthalten, zusätzlich die typischen Marker für DZ tragen.

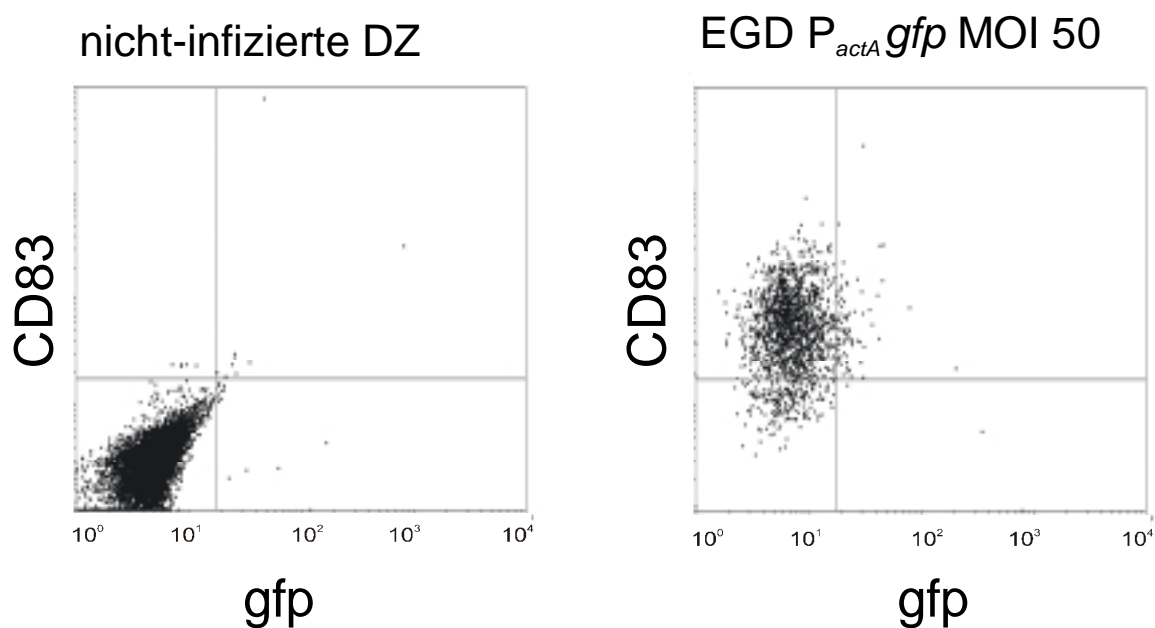


Abb. 10

Nachweis der GFP-Expression in humanen Mo-DZ nach Infektion mit *L. monocytogenes* P_{actA} gfp mit der Durchflusszytometrie (24 h p.i., MOI 50). Die x-Achse gibt die logarithmisch dargestellte GFP Fluoreszenzintensität an, die y-Achse zeigt die logarithmische PE Fluoreszenzintensität (entspricht der CD83 Expression). 4,7% der Zellen (im oberen rechten Quadranten lokalisiert), stellen sich doppelt positiv dar. Dabei handelt es sich um CD83 positive DZ, die zytosolische GFP-*L. monocytogenes* tragen.

Dafür wurden die Zellen mit CD83, CD86, und MHC Klasse II- Antikörpern markiert. Wie Abb. 10 zeigt, waren etwa 5% der Zellen sowohl CD83 markiert als auch grün-fluoreszierend.

Nach Vorbehandlung der DZ mit Cytochalasin D, das die zelluläre Aktinpolymerisation behindert und somit Phagozytose blockiert, konnten nach Infektion mit *L. monocytogenes* P_{actA} -*gfp* keine fluoreszierenden Bakterien nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass *L. monocytogenes* P_{actA} -*gfp* GFP nur innerhalb der Wirtszelle exprimiert.

5.2.3 Bestimmung der Lebendbakterienzahllzahl (CFU)

Die Anzahl an lebenden *Listerien* in DZ 1 h p.i., die nach Zellyse mit Hilfe der CFU bestimmt wurde, lag nur bei etwa 20% der DZ. Diese Zahl nahm in den folgenden vier Stunden stark ab. Danach war noch ein leichter Rückgang der Lebendzahl zu verzeichnen (Abb. 11).

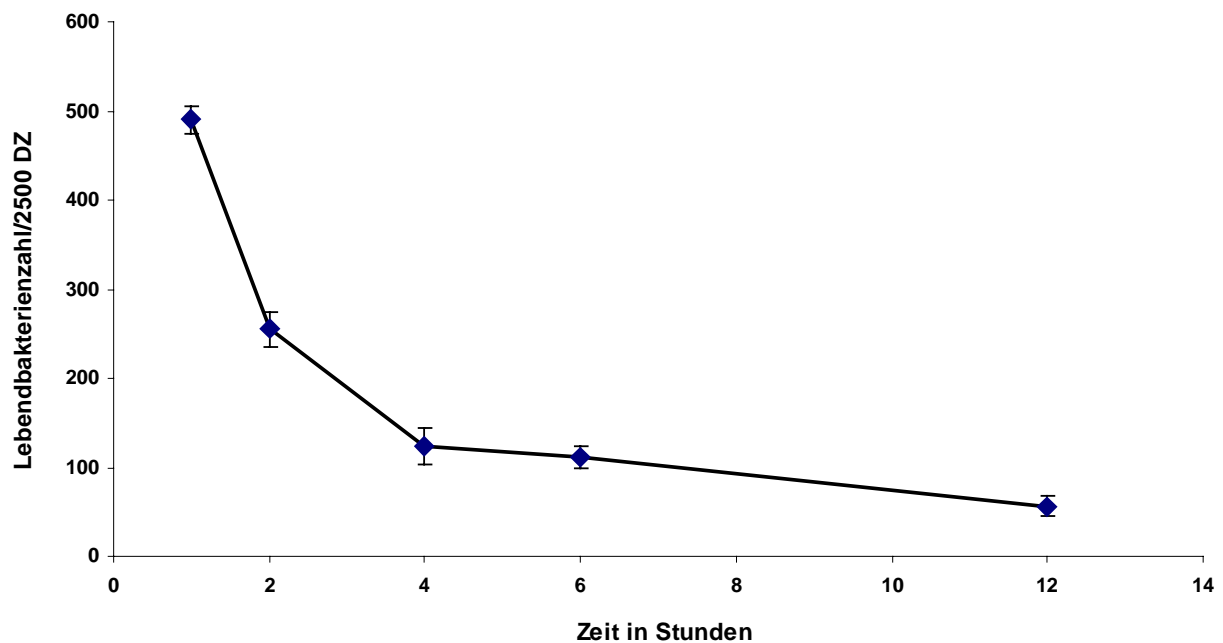


Abb. 11

Intrazelluläre Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* EGD in humanen Mo-DZ. Nach Koinkubation von *L. monocytogenes* mit DZ (MOI 50) wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert, die Anzahl der CFU bezieht sich auf 2500 DZ. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Dieses Ergebnis stimmte mit der elektronenmikroskopischen Beobachtung überein, dass die Mehrheit der aufgenommenen *Listerien* im Phagosomen verblieben. Die CFU, die nur die lebenden *Listerien* erfasst, ist nicht mit der Anzahl an aufgenommenen Bakterien gleichzusetzen.

5.2.4 Inkubation reifer DZ mit *L. monocytogenes*

Um reife DZ zu erhalten, wurden unreife DZ am 7. Tag mit einem Zytokincocktail aus TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ behandelt. Diese Zytokinmischung induziert die Ausreifung der unreifen DZ innerhalb der folgenden 3 Tage. Die Reifung der DZ wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie kontrolliert. Dabei galt die Hochregulierung von CD83 als Marker für reife DZ. Im Durchschnitt exprimierten 80% der behandelten DZ diesen Reifemarker. Interessanterweise konnten reife DZ im Unterschied zu den unreifen DZ unter gleichen Infektionsbedingungen nicht mit *Listerien* infiziert werden. Die Beurteilung der reifen, infizierten DZ nach Zytospin und Giemsa-Färbung zeigten im Vergleich zu unreifen, infizierten DZ lichtmikroskopisch nur wenige *Listerien*, die an DZ assoziiert waren (Abb.12).

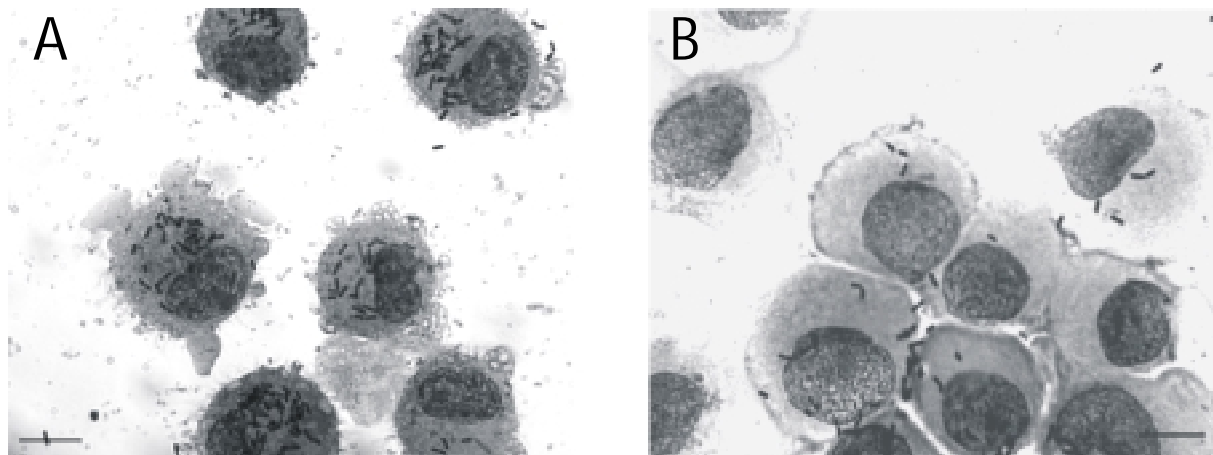


Abb. 12

Unterschiedliche Anzahl an phagozytierten *L. monocytogenes* in unreifen und reifen Mo-DZ (1 h p.i., MOI 50; Balkenlänge 10 μ m)

A. Infektion unreifer DZ

B. Infektion reifer DZ

Diese Bakterien sind jedoch wahrscheinlich nur auf der Oberfläche gebunden, da mit der Bestimmung der CFU nach der Lyse der DZ keine Bakterien nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich konnten nach Inkubation von reifen DZ mit *L.*

monocytogenes $P_{actA}Gfp$ keine zytosolischen *Listerien* mit der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden.

5.3 Charakterisierung von Faktoren, welche die Aufnahme von *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ beeinflussen

5.3.1 Beurteilung des Aufnahmeprozesses mit der TEM

In allen bisher in der Literatur beschriebenen Untersuchungen, wurden *Listerien* über den sogenannten „Zipper-Mechanismus“ in die Wirtszelle aufgenommen: Die *Listerien* binden hierzu an die Wirtszelloberfläche. Durch die sich anschließenden Veränderungen der Wirtszellmembran und des Zytoskeletts tauchen sie schließlich in die eukaryontische Zelle ein (Mengaud *et al.*, 1996). Bei diesem Vorgang, bei dem das Bakterium von der Wirtszellmembran umflossen wird, spielt die initiale Bindung des Bakteriums an die Wirtszelle eine entscheidende Rolle.

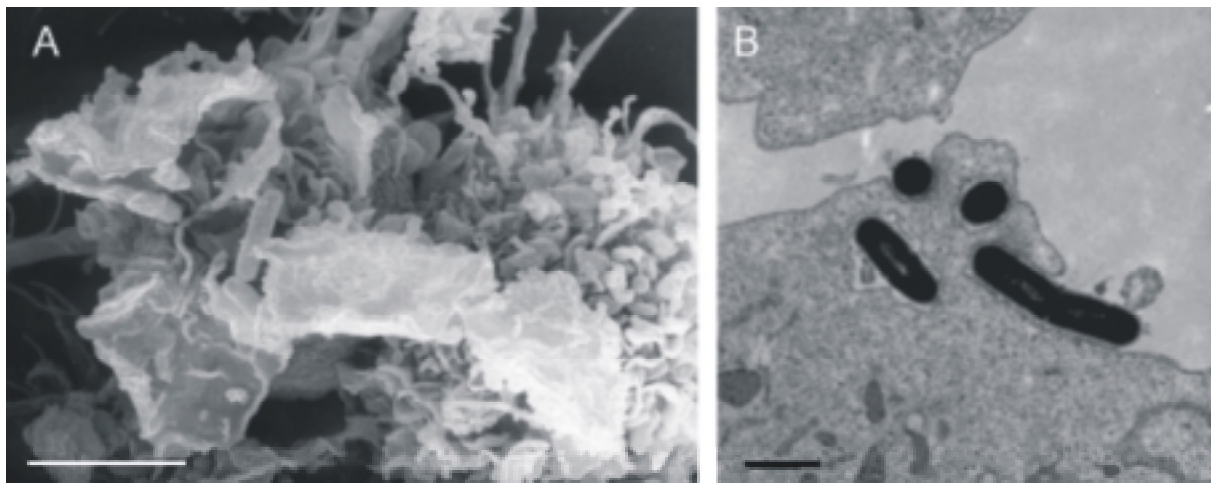


Abb. 13

A. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme 1 h nach Inkubation von *L. monocytogenes* mit humanen Mo-DZ (Balkenlänge 5 μm).

B. Die TEM zeigt den Internalisierungsprozess von *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ 1 h p.i.. Die *Listerien* sind mit dünnen Ausläufern der Plasmamembran bedeckt (MOI 50, Balkenlänge 1,1 μm),

Mit Hilfe der TEM und der Rasterelektronenmikroskopie (Raster-EM) konnte die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Mo-DZ morphologisch näher untersucht werden. Raster-EM Aufnahmen zeigten, dass die Bakterien in die zytoplasmatischen Ausstülpungen der DZ eindringen (Abb. 13 A). Während des Eintritts der *Listerien* in

die Zelle, konnte beobachtet werden, dass die zelluläre Plasmamembran über das Bakterium gleitet. Während des engen Kontakts zwischen dem Bakterium und der Wirtszelle, war die nah anliegende Membran gewellt. Größere morphologische Veränderungen der Zelloberfläche wurden nicht beobachtet (Abb. 13 B). Der beobachtete Aufnahmeprozess ähnelte somit den in der Literatur beschriebenen „Zipper-Mechanismus“.

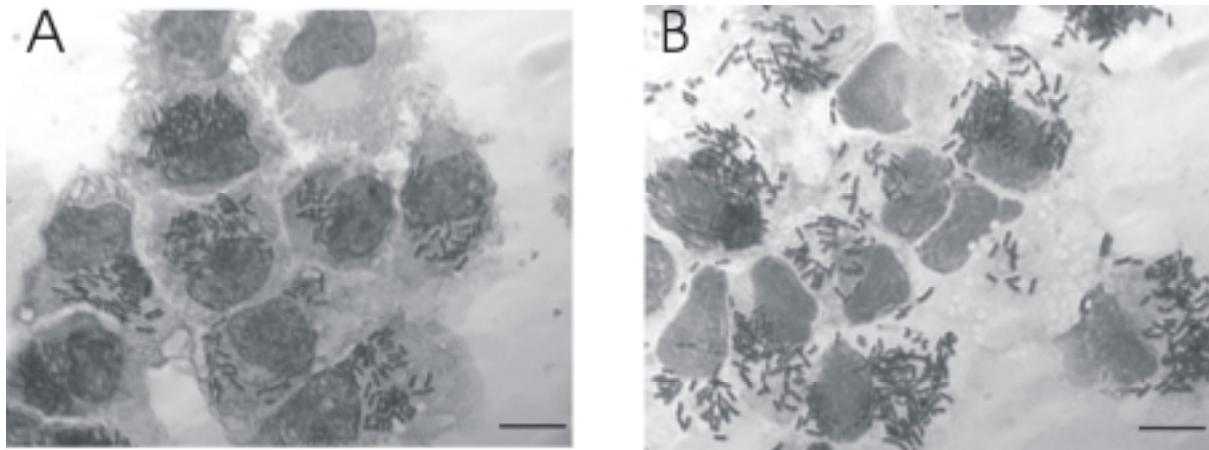


Abb. 14

Vergleichbar effektive Aufnahme von *L. monocytogenes* EGD und ihrer $\Delta inIA/B$ Mutante in humane Mo-DZ (1 h p.i., MOI 50; Balkenlänge 10 μm).

5.3.2 Humanes Plasma steigert die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Mo-DZ

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie nach Giemsa-Färbung war es möglich, quantitative Analysen des Phagozytoseprozess durchzuführen und den Einfluss von unterschiedlichen Infektionsbedingungen und Bakterienstämmen auf die Aufnahme zu untersuchen. Wie bereits erwähnt, konnte gezeigt werden, dass nahezu alle unreifen DZ mit *Listerien* infiziert wurden. Vergleichbar mit *L. monocytogenes* EGD Wildtyp, wurden nichtpathogene *L. innocua*, die *inIA/inIB* Deletionsmutante des Wildtyps (Abb.14) oder Hitze bzw. Gentamycin-getötete *L. monocytogenes* unter gleichen Infektionsbedingungen effektiv von humanen Mo-DZ aufgenommen.

Diese Infektionsexperimente wurden in der Anwesenheit von 1% autologem Plasma durchgeführt.

Im Unterschied zu der effizienten Aufnahme von *L. monocytogenes* durch Mo-DZ in Anwesenheit von humanem Plasma, resultierte eine Infektion in RPMI allein, oder in RPMI mit 10% FCS in einer 20-fach verringerten Aufnahmerate (Abb. 15 A, B; Abb. 16). Um zu untersuchen, ob dieser Unterschied durch eine längere Inkubationszeit kompensiert werden könnte, wurden *L. monocytogenes* für 15 min, 30 min, 60 min, 2

h und 4 h mit Mo-DZ inkubiert. Die Differenz zwischen der An- oder Abwesenheit von humanem Plasma blieb jedoch gleich.

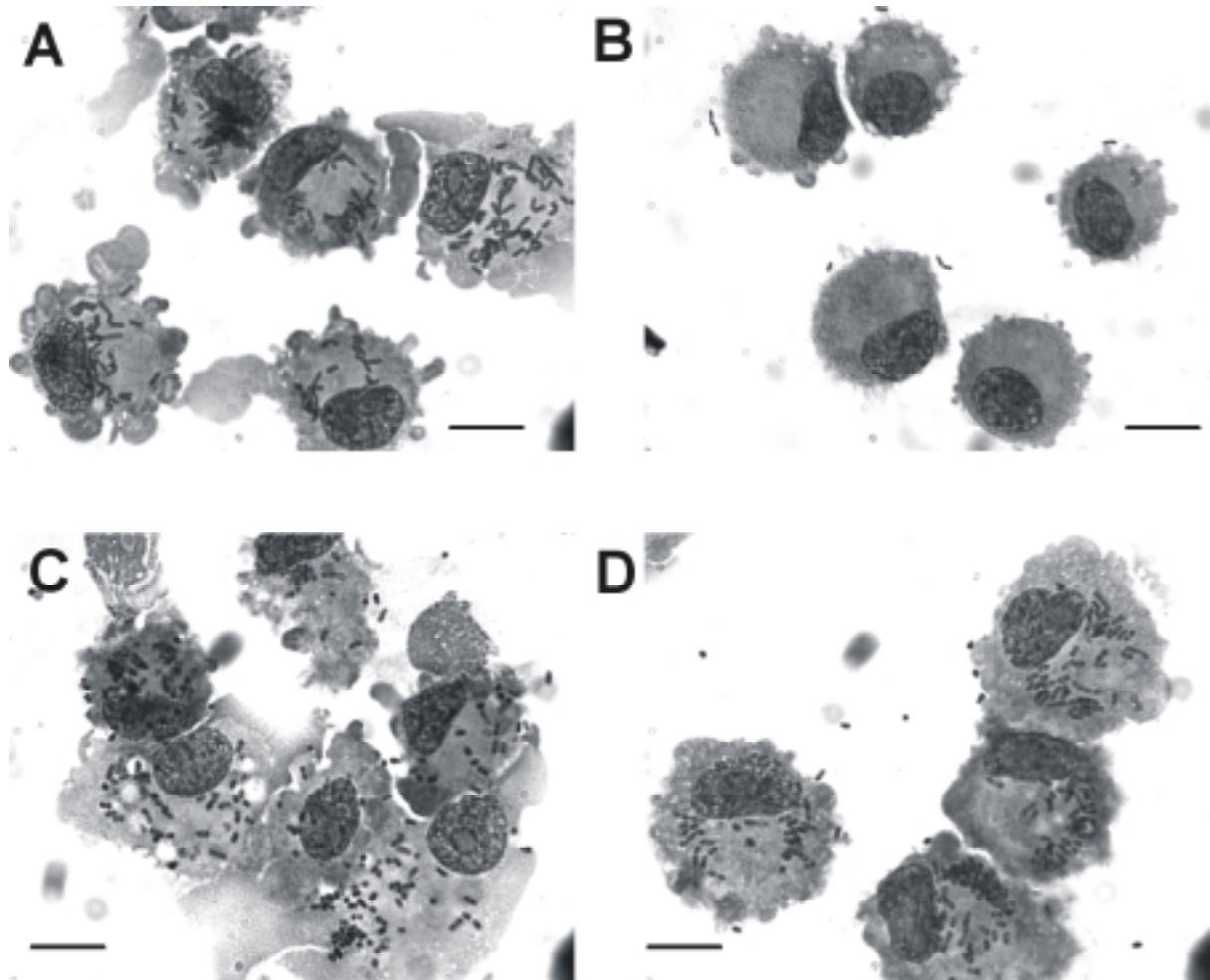


Abb. 15

Vergleich der Aufnahme von *L. monocytogenes* (A, B) und *Y. enterocolitica* (C, D) in humane Mo-DZ mit (A, C) und ohne (B, D) der Anwesenheit von 1% humanem Plasma (1 h p.i., MOI 50, Balkenlänge 10 μm).

Zum Ausschluss, dass dieser Unterschied nur durch eine verstärkte Adhäsion der Bakterien in RPMI Medium zur Plastikoberfläche der Zellkulturschale bedingt ist, wurden bakterielle Adhäsionsversuche ohne die Anwesenheit von Zellen in den Zellkulturschalen durchgeführt. *Listerien* in An- oder Abwesenheit von humanem Plasma zeigten keine nennenswerte Bindung an die Plastikoberfläche der Zellkulturschalen.

Zur Klärung der Frage, ob durch humanes Plasma bereits ein Unterschied in der Adhäsion von Bakterien an Mo-DZ festzustellen ist, wurden Adhäsionsversuche

durchgeführt. Nach Hemmung der Phagozytose mit Hilfe von Cytochalasin D erfolgte die Infektion für 1 h mit und ohne autologem Plasma. Die Anwesenheit von humanem Plasma hatte im Hinblick auf die Adhäsion der *Listerien* an Mo-DZ keinen Einfluss.

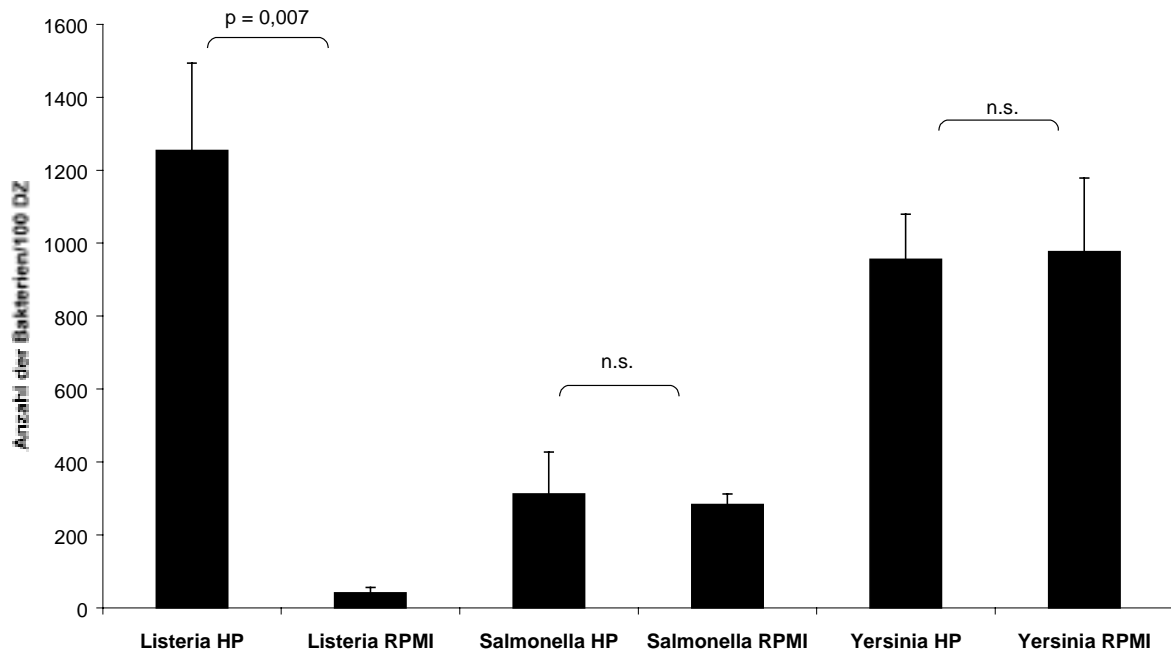


Abb. 16

Quantifizierung der aufgenommenen *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* und *Y. enterocolitica* in DZ mit und ohne der Anwesenheit von humanen Plasma. Bestimmt wurde die Anzahl intrazellulärer Bakterien pro 100 DZ nach Giemsa-Färbung (1 h p.i., MOI 20). Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten dar (n.s.= nicht signifikant).

5.3.3 Die Aufnahme von *S. typhimurium* und *Y. enterocolitica* durch Mo-DZ wird nicht durch humanes Plasma gesteigert

Um zu untersuchen, ob die Steigerung der listeriellen Aufnahme in Anwesenheit von humanem Plasma für *Listerien* spezifisch ist, oder auch bei anderen Bakterien beobachtet werden kann, wurden Experimente mit *S. typhimurium* und *Y. enterocolitica* unter gleichen Infektionsbedingungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Aufnahme dieser Gram-negativen *Enterobacteriaceae* unabhängig von humanem Plasma war (Abb. 15 C, D, Abb. 16). Interessanterweise war die Aufnahme von *S. typhimurium* und insbesondere *Y. enterocolitica* durch Mo-DZ in RPMI Medium weitaus höher als die von *L. monocytogenes* (Abb. 16).

5.3.4 Die gesteigerte listerielle Aufnahme in Anwesenheit von humanem Plasma ist durch Immunglobulin-Opsonisierung der *Listerien* bedingt

Es wurde nun untersucht, welche der Faktoren im Plasma für die gesteigerte Aufnahme von *L. monocytogenes* in Mo-DZ verantwortlich ist.

Der Zusatz von humanem Serumalbumin zum RPMI Medium (5%) während der Inkubation führte im Vergleich zu RPMI zu keiner gesteigerten Infektionsrate (Abb. 17). Zwischen humanem Plasma und Serum wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet. Dies schloss eine aktive Rolle von Gerinnungsfaktoren wie Fibrinogen für den Aufnahmeprozess von *L. monocytogenes* in humane DZ weitgehend aus (Abb. 17).

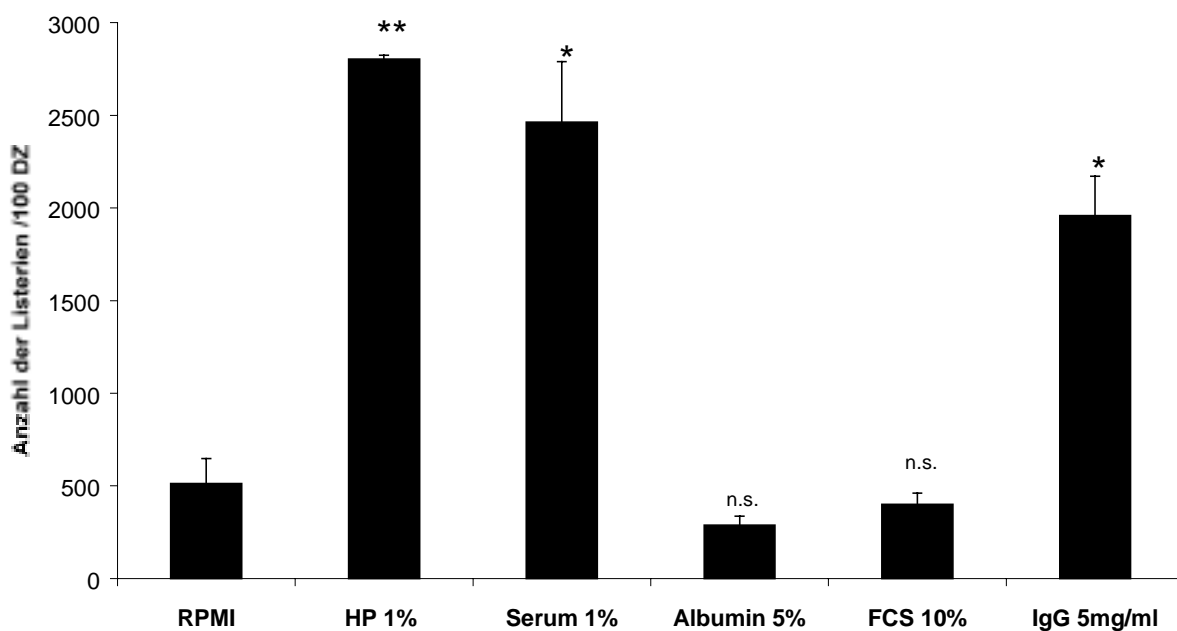


Abb. 17 A

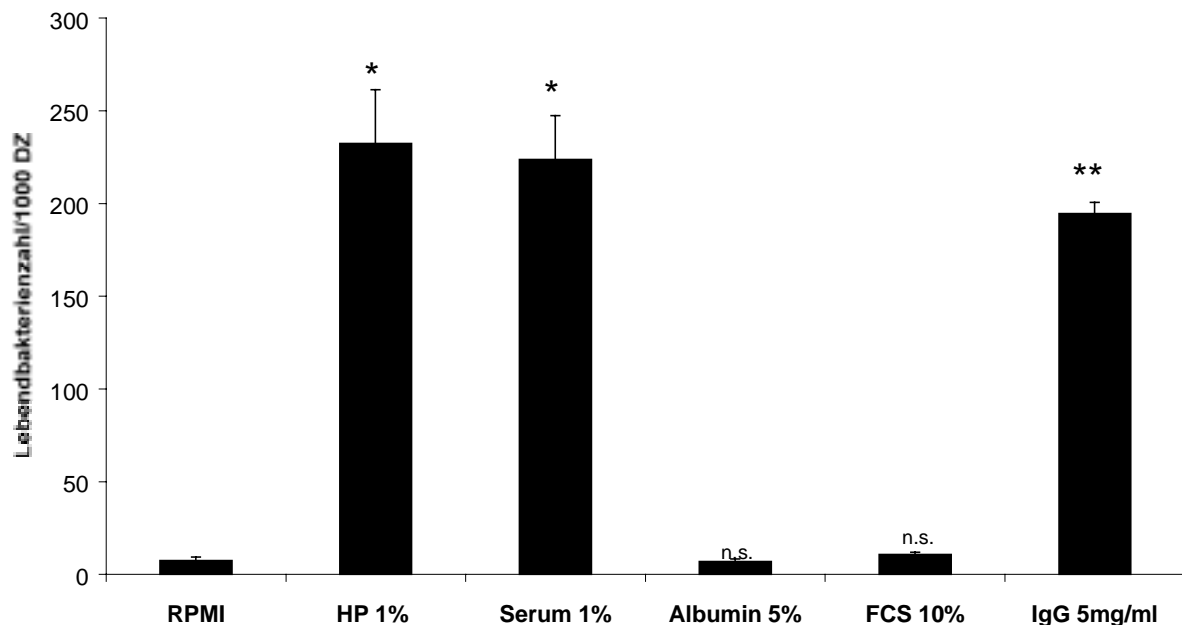


Abb. 17 B

Abb. 17

Untersuchung der Abhängigkeit der Aufnahme von *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ von unterschiedlicher Infektionsmedien (1 h p.i., MOI 50).

A. Bestimmung der Anzahl intrazellulärer Bakterien pro 100 DZ nach Giemsa-Färbung

B. Bestimmung der CFU pro 1000 DZ.

Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten dar (* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, n.s.= nicht signifikant)

Die Internalisierung von *L. monocytogenes* durch DZ wurde in Anwesenheit von Hefe-Mannan geprüft. Mannan ist ein etablierter, kompetitiver Inhibitor des Mannose/Fucose Rezeptors. In einer Konzentration von 5 mg/ml im Infektionsmedium beeinflusste Mannan die Aufnahmerate nicht. Dieses Ergebnis schloss eine Rolle des Mannose Rezeptors, der auf humanen DZ exprimiert wird, für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Mo-DZ aus.

Nach Vorbehandlung der Mo-DZ mit Cytochalasin D, welches die zelluläre Aktinpolymerisation blockiert, wurde die listerielle Aufnahme beinahe komplett gehemmt. Der Internalisierungsprozess erfordert somit eine intakte Aktinmikrofilament Polymerisation. Kaplan zeigte 1977, dass die Aktinmikrofilament insbesondere für Phagozytose über FC-Rezeptoren essentiell sind. Bei einer Aufnahme über den Komplementrezeptor C3 scheinen sie einen geringeren Einfluss

zu haben. Aus diesem Grund wurde die Bedeutung von Immunglobulinen auf die Phagozytose von *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ analysiert. Steigende Konzentrationen von 1 mg/ml- 10 mg/ml eines humanen Immunglobulin-Pools der Firma Sandoz wurden dem RPMI Medium hinzugefügt. Die Ergebnisse mit Hilfe der Beurteilung nach einer Giemsa-Färbung zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Phagozytose (Abb. 18 A).

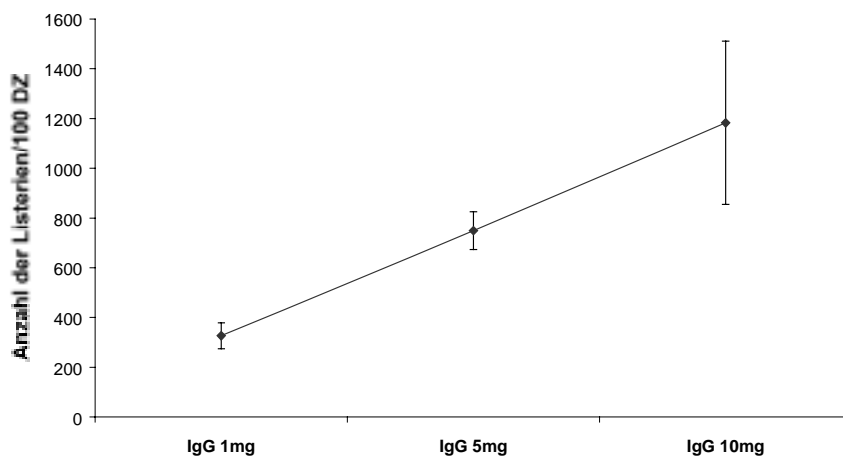


Abb. 18 A

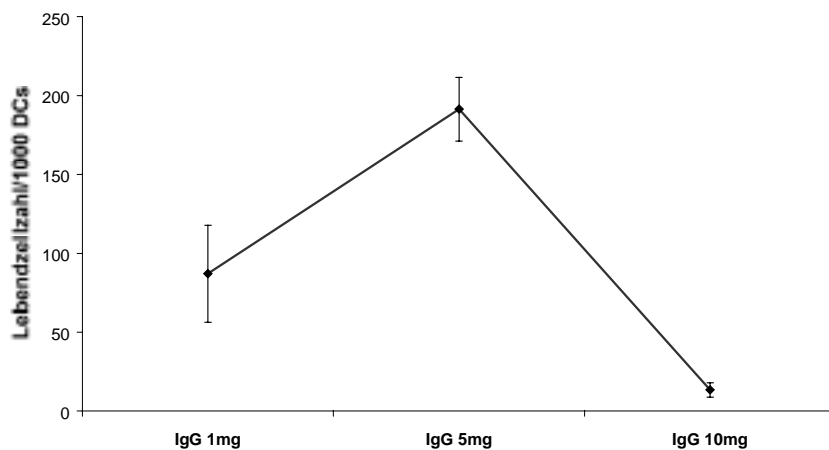


Abb. 18 B

Bestimmung der internalisierten *L. monocytogenes* EGD in DZ nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an humanen Immunglobulinen zum Infektionsmedium.

A. Bestimmung der Anzahl intrazellulärer Bakterien pro 100 DZ nach Giemsa-Färbung

B. Bestimmung der CFU pro 1000 DZ

Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten dar.

Interessanterweise wurde mit der CFU bei steigender Immunglobulinkonzentration ein Abfall an lebenden Bakterien nachgewiesen (Abb. 18 B).

Diese Daten deuteten darauf hin, dass Immunglobuline für die erhöhte Aufnahme von *L. monocytogenes* in DZ verantwortlich sind. Die sinkende Anzahl an lebenden *Listerien* bei steigender Immunglobulinkonzentration lässt sich mit einer effizienteren Eliminierung der lebenden Bakterien durch die Mo-DZ nach Opsonisierung der *Listerien* erklären.

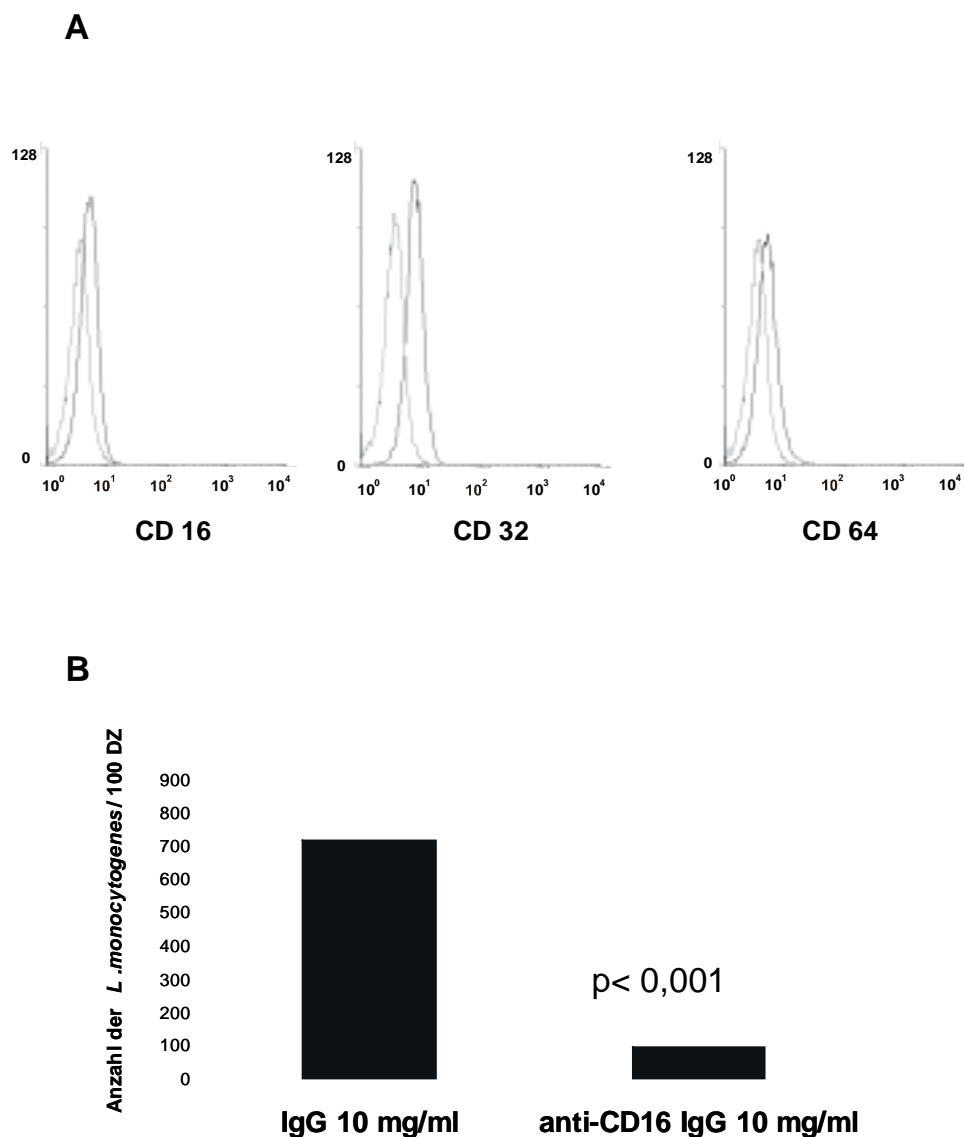


Abb. 19

Durchflusszytometrie der Oberflächenmarkerexpression von CD16, CD32 und CD64 auf unreifen Mo-DZ. Die x-Achse zeigt die logarithmisch dargestellte Fluoreszenzintensität, die y-Achse die relative Zellzahl. Graue Histogramme repräsentieren die zugehörigen Isotypantikörper.

Bestimmung der aufgenommenen *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ in Anwesenheit von IgG (10 mg/ml) mit und ohne blockierender CD16 Antikörper (MOI 20, 30 min p.i., Giemsa-Färbung).

5.3.5 Anti-CD16 Antikörper reduzieren die Phagozytose von *L. monocytogenes* in Mo-DC

Die hohe Aufnahme von *Listerien* in Mo-DZ in Anwesenheit von Immunglobulinen lässt darauf schließen, dass FC-Rezeptoren am Phagozytoseprozess beteiligt sind. Humane, unreife Mo-DZ exprimierten FC γ RI (CD64), FC γ RII (CD32) und FC γ RIII (CD16) schwach auf ihrer Oberfläche (Abb.19 A). Eine Blockierung des FC γ RIII Oberflächenrezeptors führte zu einer signifikant verringerten Aufnahme von *L. monocytogenes* in Anwesenheit von Immunglobulinen (Abb.19 B). Diese Daten wiesen darauf hin, dass die Phagozytose von *L. monocytogenes* in Mo-DZ FC γ RIII- vermittelt ist.

5.3.6 Antikörper gegen listerielles p60 Protein agieren als wichtigstes Opsonin für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Mo-DZ

Die Immunoblot-Analysen zeigten, dass alle verwendeten humanen Plasmen und Seren gesunder Spender, sowie die kommerziell erhältlichen, gepoolten Immunglobuline Antikörper gegen *L. monocytogenes* besitzen (Abb. 20).

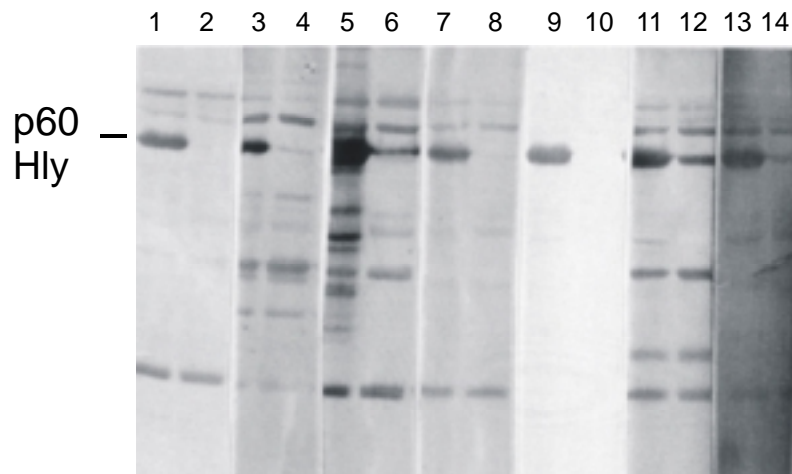


Abb. 20

Immunoblotanalyse der Plasmen von 5 gesunden Individuen mit Hilfe der Überstandsproteine von *L. monocytogenes* EGD/*pprfA** (Spur 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13) oder mit Überstandsproteinen der p60 Deletionsmutante/*pprfA** (Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14). *pprfA** Stämme sind durch eine hohe Expression an positiven Regulatorfaktor PrfA, der die Expression von listeriellen Virulenzgenen kontrolliert, charakterisiert. Spur 1 und 2 wurden mit Plasma 1, Spur 3 und 4 mit Plasma 2, Spur 5 und 6 mit Plasma 3, Spur 7 und 8 mit Plasma 4, Spur 9 und 10 mit p60 spezifischen, monoklonalen Maus Antikörper K3A7 (Rowan *et al.*, 2000) als Positivkontrolle, Spur 11 und 12 mit humanen Serum und Spur 13 und 14 mit humanen Immunglobulinen behandelt (Hly = Listeriolysin).

Interessanterweise wurden in den gleichen Plasmen und Seren ebenso Antikörper gegen *S. typhimurium* und *Y. enterocolitica* nachweisen. Dennoch übten nur die *Listeria*-spezifischen Antikörper einen Einfluss auf die Phagozytose in humane Mo-DZ aus. Die Aufnahme von *S. typhimurium* und *Y. enterocolitica* war von spezifischen Antikörpern unabhängig. Die Western-Blot Untersuchungen zeigten, dass das listerielle p60 Protein eine immunreaktive Hauptkomponente in allen Proben darstellte (Abb. 20). Nach Präadsorption von Immunglobulinen mit *L. monocytogenes* (10^{10} Bakterien/ml, 12 h, 4°C) zeigte, dass bei der Verwendung der präadsorbierten Immunglobuline eine signifikant reduzierte Aufnahme von *L. monocytogenes*, verglichen mit nicht-adsorbierten Plasma, resultierte (Abb. 21). Einen starken Hinweis für die Annahme, dass p60 Antikörper das Haupt-Opsonin für die Phagozytose von *L. monocytogenes* in Mo-DZ darstellt, wurde durch die Verwendung einer erst kürzlich konstruierten *iap*-Deletionsmutante (Pilgrim *et al.*, Manuskript in Bearbeitung) erreicht. Diese Mutante produziert kein p60. Die Präadsorption von Immunglobulinen mit dieser Mutante führte im Unterschied zur Präadsorption mit dem Wildtyp zu keiner signifikant verringerten Aufnahme von *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ (Abb. 21).

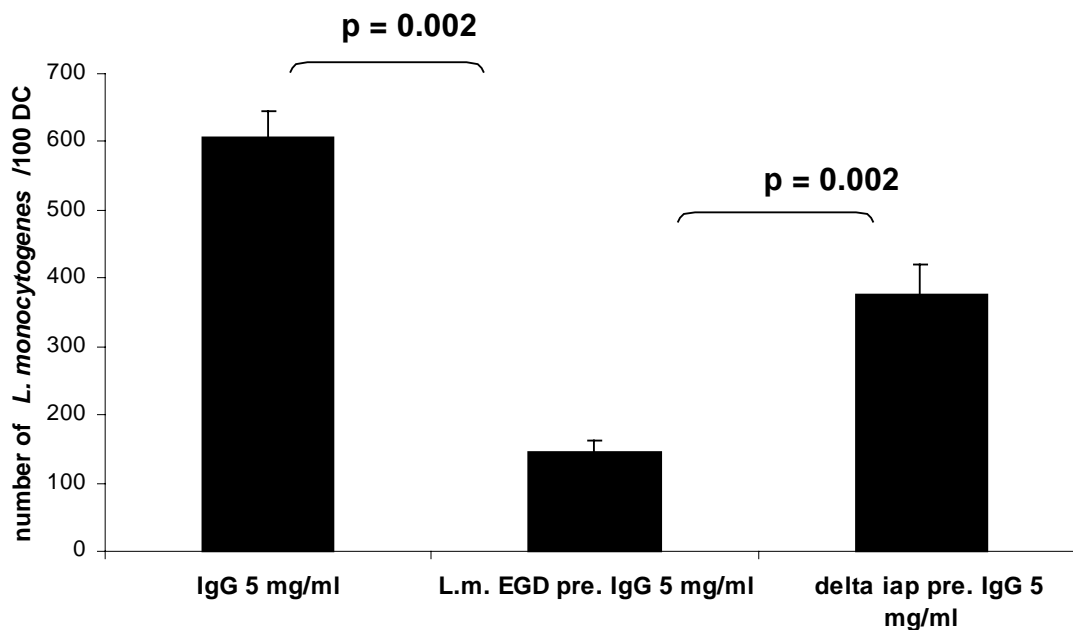


Abb. 21

Vergleich der Phagozytoserate von *L. monocytogenes* in Mo-DZ mit IgG (5 mg/ml), *L. monocytogenes*-präadsorbierte IgG (5 mg/ml) and Δiap -präadsorbierte IgG (5 mg/ml) (MOI 20, 30 min p.i., Giemsa-Färbung).

Zusätzlich zeigte die Aufnahme rate dieser Mutante nur geringe Differenzen bei An- und Abwesenheit von humanem Plasma während der Inkubationszeit. Im Vergleich zum Wildtyp, bei dem die Aufnahme mit humanem Plasma 20-fach gesteigert war, beobachtete man bei der Verwendung der Mutante nur eine Verdopplung der Phagozytoserate (Abb. 22). Im Unterschied dazu zeigte die Infektion mit der *hly*-Deletionsmutante, welche kein Listeriolysin mehr produzieren kann, immerhin noch eine 10-fache Steigerung der Aufnahme rate bei Anwesenheit von Plasma (Abb. 22).

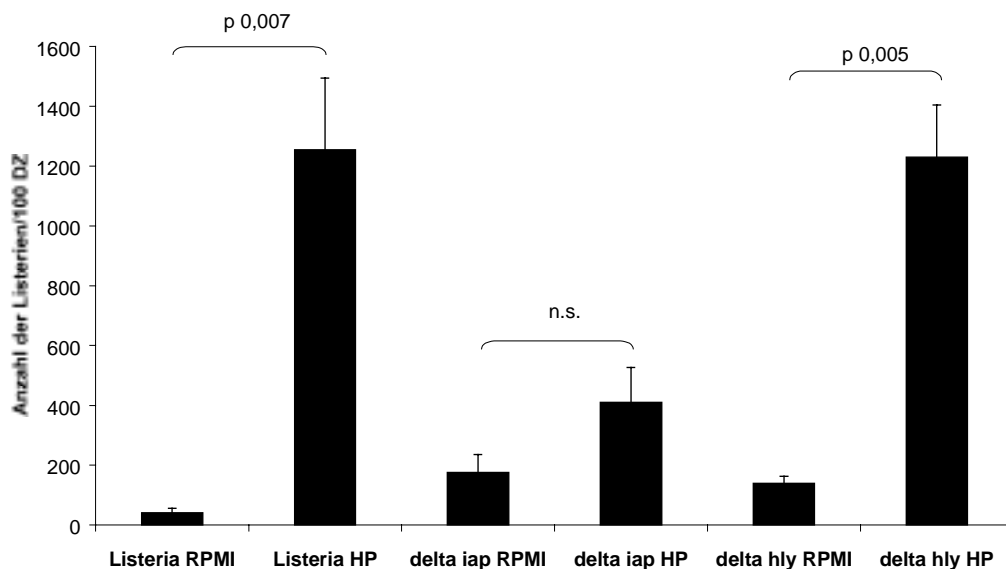


Abb. 22

Quantifizierung der Aufnahme von *L. monocytogenes* Δiap und Δhly in humane Mo-DZ mit und ohne Anwesenheit von humanem Plasma im Vergleich zum Wildtyp. Bestimmung der Anzahl intrazellulärer Bakterien pro 100 DZ nach Giemsa-Färbung (1 h p.i., MOI 20; n.s.= nicht signifikant).

Im Vergleich zu anti-p60 Antikörpern wurden Antikörper gegen Listeriolysin nur in geringer Konzentration in einigen Plasmen/Seren Proben nachgewiesen (Abb. 20).

5.4 Veränderter Phänotyp *L. monocytogenes*-infizierter DZ

5.4.1 Morphologische Veränderung *Listerien*-infizierter DZ

Im Unterschied zu nicht-infizierten, unreifen DZ, adhärten infizierte Zellen noch während der Inkubationszeit an die Oberfläche der Zellkulturplatten.

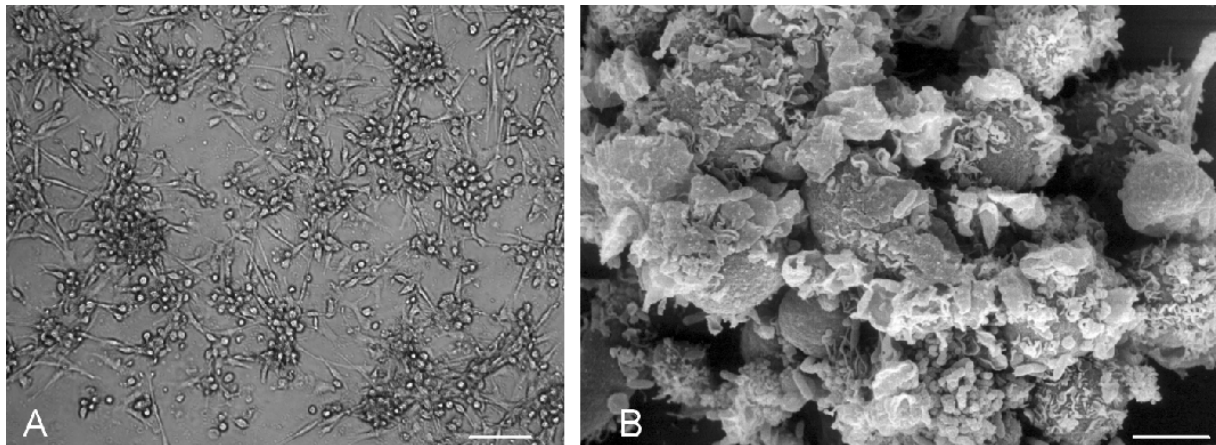


Abb. 23

L. monocytogenes-infizierte DZ (2 h p.i., MOI 50)

A. Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der Zellcluster (Balkenlänge 100 µm).

B. Raster-EM Aufnahme. Die Klumpenbildung der infizierten DZ ist deutlich zu erkennen (Balkenlänge 10 µm).

Zusätzlich wurde eine Zellklumpenbildung beobachtet (Abb. 23). Diese beiden morphologischen Phänomene wurden ebenso beobachtet, wenn zu den noch unreifen DZ, Zytokincocktail dazugegeben wurde. Die adhären DZ und die entstandenen Zellcluster lösten sich jedoch innerhalb der folgenden 72 h. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die infizierten DZ im Phasenkontrastmikroskop die charakteristische Morphologie terminal ausgreifender DZ (Abb. 9).

5.4.2 Veränderte Oberflächenmolekül-Expression *Listerien*-infizierter DZ

Nachdem beobachtet wurde, dass die morphologischen Veränderungen *Listerien*-infizierter DZ denen der durch Zytokincocktail ausgereiften DZ entsprachen, stellte sich die Frage, ob sich diese Entsprechung auch hinsichtlich der Oberflächenmarker Expression der infizierten DZ finden würde.

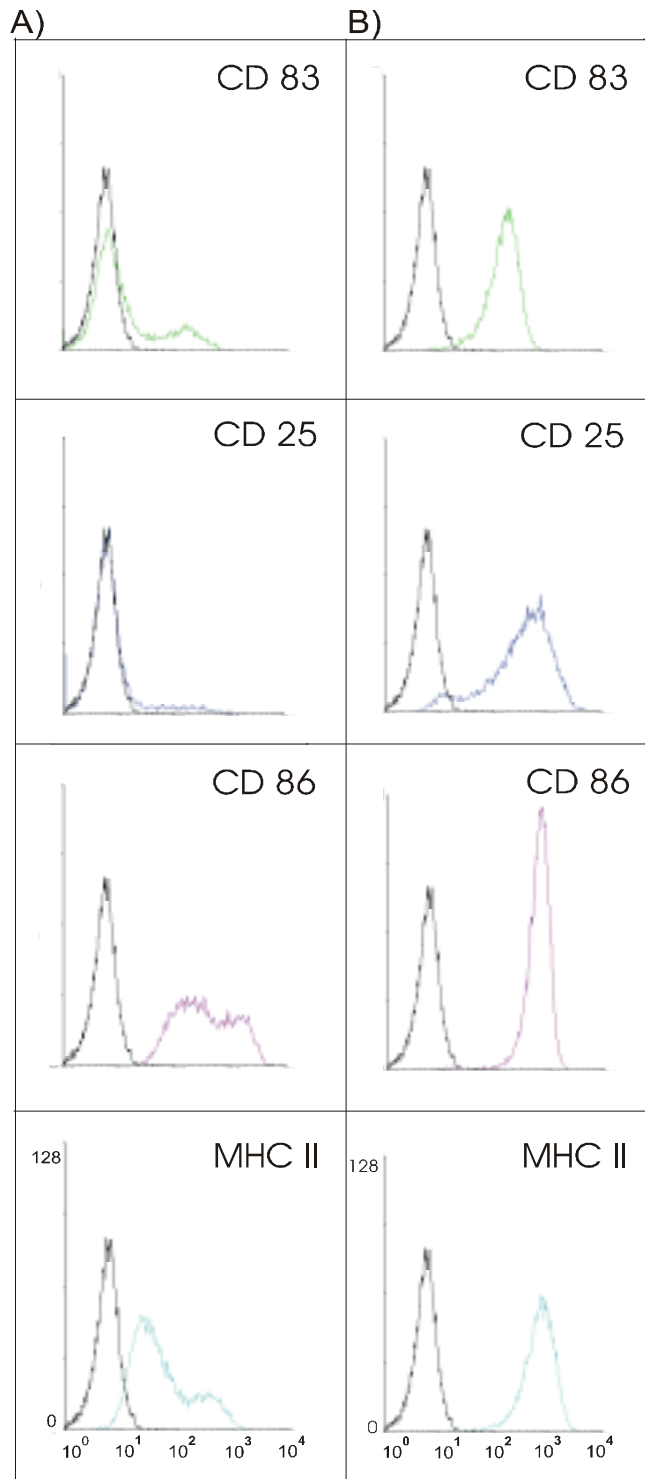


Abb. 24

Durchflusszytometrisches Profil der Oberflächenmarkerexpression von CD83, CD25, CD86, und MHC Klasse II auf humanen Mo-DZ.

A. nicht-infizierte DZ

B. *L. monocytogenes*-infizierte DZ (16 h p.i., MOI 50)

Die x-Achse zeigt die logarithmisch dargestellte Fluoreszenzintensität; die y-Achse die relative Zellzahl. Schwarze Histogramme repräsentieren die zugehörigen Isotypantikörper.

Mit der Durchflusszytometrie wurde die Expression einiger charakteristischer Moleküle von infizierten und nicht-infizierten DZ verglichen. Alle in dieser Arbeit verwendeten pathogenen und apathogenen Listerienstämme zeigten den gleichen Effekt auf das Oberflächenmarkerprofil. CD83, der spezifische Reifemarker für humane DZ wurde bereits nach 4 h p.i. stark hochreguliert. Zwischen 85-95% der DZ exprimierten CD83 auf ihrer Oberfläche; dies weist auf einen Reifungsprozess der infizierten Zelle hin. Neben CD83 wurde die Expression von MHC Klasse II, kostimulatorischem Molekül CD86 und CD25 (IL-2 Rezeptor, α Kette) untersucht. Alle diese Moleküle wurden hochreguliert (Abb. 24). Die *Listerien*-infizierten DZ entsprachen somit im Hinblick auf die Morphologie und Phänotyp Zytokincocktail-ausgereiften DZ.

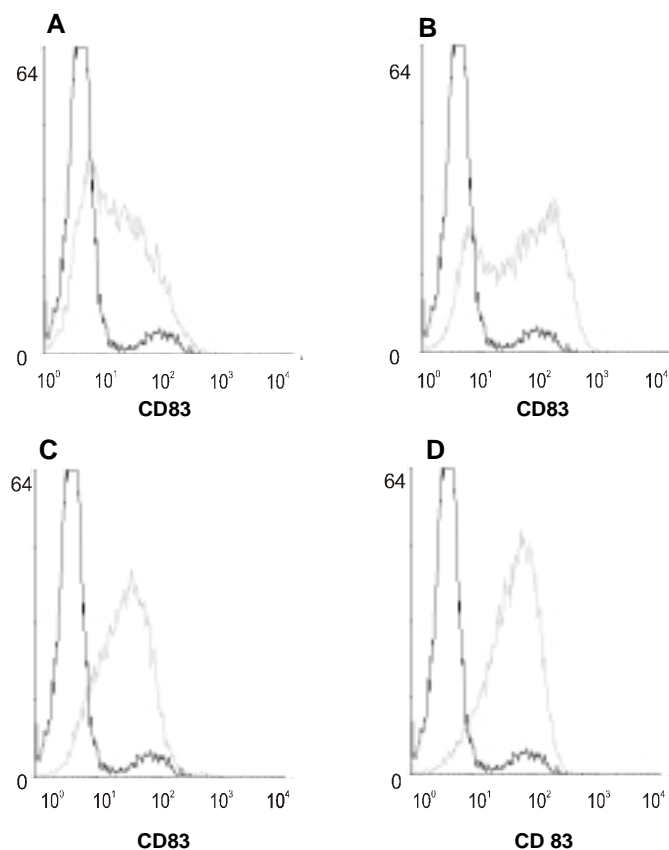


Abb. 25

Durchflusszytometrie der Oberflächenmarkerexpression von CD83 auf humanen DZ (24 h p.i.; MOI 50)

A. *E. coli* DH10b

B. *S. flexneri* $\Delta ipaB$

C. *S. typhimurium* SL7207

D. *Y. pseudotuberculosis*.

Schwarze Histogramme stellen uninfizierte DZ dar. Die x-Achse zeigt die logarithmisch dargestellte Fluoreszenzintensität; die y-Achse die relative Zellzahl.

Im Vergleich zu *L. monocytogenes* führte eine Infektion DZ mit den Gram-negativen Bakterien *E. coli*, *Shigella flexneri*, *S. typhimurium* und *Y. pseudotuberculosis* nur bei den beiden letztgenannten Stämmen zu einer vergleichbaren Ausreifung der DZ (Abb. 25).

5.5 Untersuchung listerieller Faktoren, die Reifung der infizierten DZ induzieren

Um zu untersuchen, ob der Reifungsprozess der *Listerien*-infizierten DZ von der bakteriellen Phagozytose abhängig war, oder allein durch die Anwesenheit von *Listerien* und ihren löslichen Produkten bedingt ist, wurden Versuche mit dem Doppel-Kammer-Zellsystem durchgeführt. Bei diesem System lassen sich zwei Zellpopulationen über eine Membran mit unterschiedlicher Porengröße trennen. Für eine effektive Separation von *Listerien* und DZ wurde eine Porengröße von 0,2 µm gewählt. Die alleinige Anwesenheit der Membran in einer DZ-Zellkultur löste keinen Effekt auf die Oberflächenmolekülexpression der DZ aus. Befanden sich *Listerien* abgetrennt von den Zellen oberhalb der Membran, regulierten die darunterliegenden DZ den Reifemarker CD83 (16 h p.i.) immerhin zu 60% hoch. Ähnlich hohe CD83 Expression entwickelten die DZ bei alleiniger Zugabe von 10% listeriellen Bakterienkulturüberstand zur Zellkultur. Beide Experimente wiesen darauf hin, dass bakterielle Partikel und/oder metabolische Produkte der *Listerien*, mit einem Durchmesser unter 0,2 µm zumindest partiell zur Reifung humaner DZ führen können. Befanden sich jedoch sowohl DZ als auch Bakterien im oberen Teil des Doppel-Kammer-Zellsystems, zeigten die im unterem Teil befindlichen DZ 16 h p.i. eine CD83 Expression von über 80%. Aus den Ergebnissen konnte man zusätzlich schließen, dass infizierte DZ Zytokine ausschütten und diese Zytokine wiederum einen Reifungseffekt von nicht infizierten DZ bewirken können. Im Anschluss wurden Versuche durchgeführt, bei denen die DZ mit Hitze- bzw. Gentamycin getöteten Bakterien oder den apathogenen *L. innocua*-Stamm infiziert wurden. Diese Zellen zeigten den gleichen Reifungseffekt wie die mit lebenden, pathogenen *Listerien* infizierten DZ. Der Eintritt phagozytierter *Listerien* in das Wirtszellzytosol ist somit für die phänotypische Differenzierung der infizierten DZ nicht essentiell.

5.5.1 Listerielle LTA induziert Reifung in humanen MO-DZ

Es ist bekannt, dass unterschiedliche Stimuli die Reifung von DZ bewirken. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem LPS Gram-negativer Bakterien. Da *Listerien* als Gram-positive Bakterien kein LPS jedoch LTA besitzen, wurde listerielle LTA im

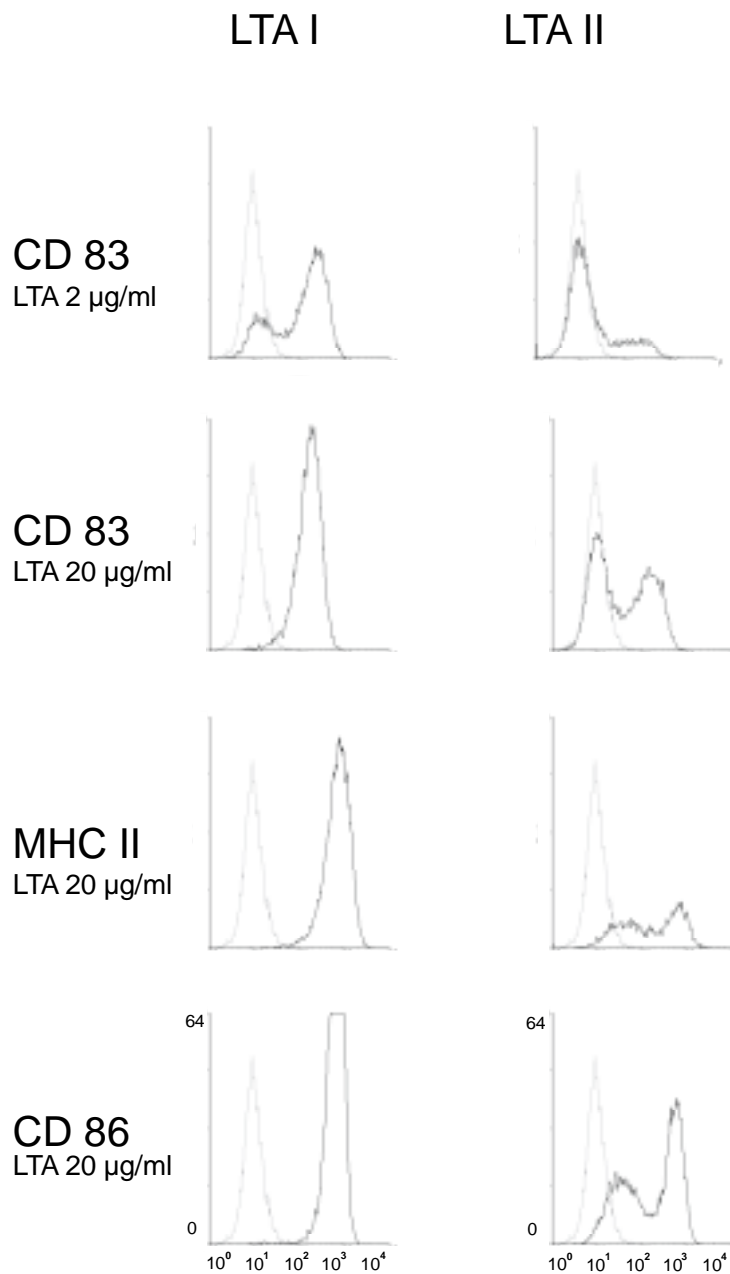


Abb. 26

Durchflusszytometrie der Oberflächenmarkerexpression von CD83, MHC II und CD86 auf humanen DZ nach Behandlung mit den unterschiedlichen Fraktionen von LTA (24 h p.i.; MOI 50).

Graue Histogramme repräsentieren den zugehörigen Isotypantikörper. Die x-Achse zeigt die logarithmisch dargestellte Fluoreszenzintensität; die y-Achse die relative Zellzahl.

Hinblick auf einen Reifungseffekt auf DZ untersucht. Die listerielle, negativ geladene LTA besteht aus einem Glycerolphosphat mit Zucker und Fettsäureseitenketten (FSSK). Nach Separation auf einer Octyl-Sepharose CL-4B Säule existieren zwei unterschiedliche Fraktionen der listeriellen LTA, die als LTA I und LTA II bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich in der Anzahl ihrer FSSK. Im Unterschied zur LTA I, die zwei FSSK besitzt, ist die LTA II-Fraktion mit vier FSSK ausgestattet. Die zwei unterschiedlichen LTAs wurden auf ihren Reifungseinfluss auf DZ untersucht. Nach Zugabe der listeriellen LTA in einem Bereich von 2 bis 20 µg/ml zur DZ-Zellkultur konnte man bei beiden Fraktionen beobachten, dass die DZ auf der Kulturschale adhärten und Zellcluster bildeten. Die Untersuchung der Oberflächenmolekülexpression ergab, dass die DZ nach 24 h Kokultivierung in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten LTA eine Hochregulierung aller Reifemarker zeigten. Interessanterweise stimulierte die LTA I Fraktion DZ effektiver als die LTA II (Abb. 26). Dies wies darauf hin, dass die FSSK eine Rolle bei der Aktivierungskapazität spielen.

Ein indirekter Beweis dafür, dass der Reifungseffekt durch die listerielle LTA bedingt war und nicht durch LPS Verunreinigung zustande kam, gelang mit Hilfe von Polymyxin B. Polymyxin B zerstört die Struktur von LPS. Wurde sowohl listerielle LTA als auch LPS von *E. coli* Serotyp 0128:B12 mit 50 µg/ml Polymyxin B vorbehandelt, konnte man eine signifikante Hemmung der Ausreifung DZ nur bei der Anwendung von LPS feststellen. Die Polymyxin B vorbehandelte LTA behielt ihre Reifungskapazität. Ein weiterer Beweis für den Effekt von listerieller LTA gelang mit Hilfe von Polyarginin. Diese Substanz lagert sich auf Grund ihrer positiven Oberflächenladung an die negativ geladene LTA und hemmt somit die Bindungskapazität der LTA an Zellen. Wurde listerielle LTA mit 10 µg/ml Polyarginin präinkubiert, war der Reifungseffekt auf DZ im Vergleich zur unbehandelten LTA geringer.

Lösliches CD14, das im humanen Plasma vorkommt, ist als Rezeptor für LPS identifiziert worden (Verhasselt *et al.*, 1997). Gebunden an CD14 gelangt LPS zur Mo-DZ und führt somit zur Ausreifung der DZ. Um im Plasma vorhandenes lösliches CD14 als möglichen Rezeptor der LTA zu analysieren, wurden DZ 30 min mit 25 µg/ml anti-CD14 Antikörpern (Pharmingen) präinkubiert. Diese Antikörper verblieben auch während der Kokultivierung der DZ mit 10 µg/ml LTA oder 1 ng/ml LPS im Zellkulturmedium. Anti-CD14 Antikörper blockierten die vorhandenen löslichen CD14

Moleküle und die eventuell noch vorhandenen, jedoch in der Durchflusszytometrie nicht mehr nachweisbaren CD14 Moleküle auf der Oberfläche der DZ. Diese Behandlung führte nach Zugabe der LPS oder der listeriellen LTA in beiden Fällen zu einer verringerten Hochregulierung von MHC Klasse II und CD83 der DZ. Abbildung 27 zeigt die verringerte CD83 Expression durch listerielle LTA nach anti-CD14 Vorbehandlung.

Neben der listeriellen LTA führte auch chromosomale DNA von *L. monocytogenes* in einer Konzentration von 3 µg/ml im Zellkulturmedium nach 24 h zur Hochregulierung von CD83 und kostimulatorischen Molekülen.

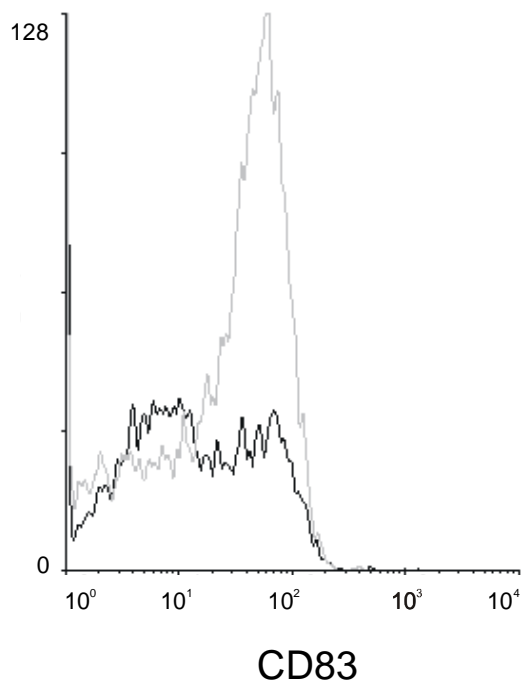


Abb. 27

Durchflusszytometrie der Oberflächenmarkerexpression von CD83. LTA I (10 µg/ml)-behandelte DZ (12h) ohne und mit anti-CD14. Das graue Histogramm stellt die CD83 Hochregulierung ohne Zugabe von anti-CD14, das schwarze Histogramm die CD83 Hochregulierung mit anti-CD14 dar.

Ein vorheriger Verdau der chromosomalen DNA mit DNase I (Pharmacia) für 1 h bei 37°C verhinderte zum Teil diese Hochregulierung. Der Verdau der chromosomalen DNA in einzelne Nukleotide gelang nicht komplett. Aus diesem Grund war es nicht verwunderlich, dass nach Behandlung DZ mit dieser inkomplett verdauten DNA immer noch eine Hochregulierung von CD83, MHC Klasse II und den

kostimulatorischen Molekül CD86 der DZ im Unterschied zu nicht stimulierten DZ zu beobachten war. Im Vergleich zur Zugabe unverdauter, listerieller DNA zu unreifen DZ, bei der 76,6 % der Zellen CD83 hochregulierten, besaßen nur 52,1 % der DZ nach Behandlung mit verdauter DNA dieses Oberflächenmolekül.

5.6 *L. monocytogenes*-infizierte Mo-DZ aktivieren allogene T-Lymphozyten

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde gezeigt, dass eine Infektion mit *L. monocytogenes* bzw. die Inkubation DZ mit listerieller LTA zu einer ausgeprägten Veränderung der Oberflächenmolekülexpression dieser Zellen in Richtung reife DZ führte. Um zu beurteilen, ob die nachgewiesene Hochregulierung der Oberflächenmoleküle eine funktionelle Konsequenz mit sich bringt, wurde die allostimulatorische Aktivität der infizierten DZ mit Hilfe der gemischten Leukozytenreaktion (MLR) untersucht. Allogene T-Zellen wurden in Anwesenheit von DZ zum Wachstum stimuliert. Anhand der Proliferationsrate der T-Zellen, ließ sich die stimulatorische Fähigkeit der DZ bestimmen. Die proliferierenden T-Zellen wurden durch den Einbau von radioaktiv markierten Thymidin nachgewiesen. Abbildung 28 zeigt die radioaktive Thymidin-Count Rate der mit unterschiedlich behandelten DZ stimulierten T-Zellen.

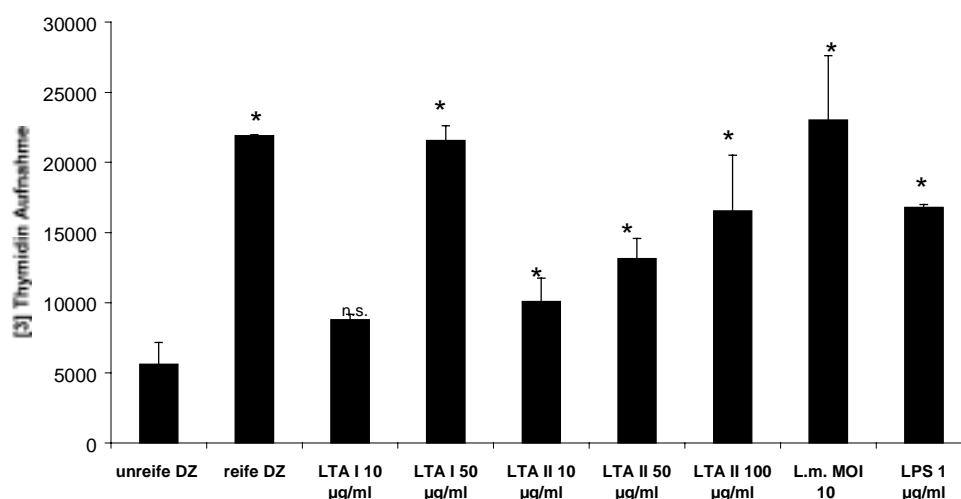


Abb. 28

Überprüfung der T-Zell Stimulierbarkeit unterschiedlich behandelter, humaner Mo-DZ (24 h) mit Hilfe der MLR. Die abgebildeten Messwerte entsprechen einem DZ/T-Zell Verhältnis von 1:100. T-Zellen proliferieren in Anwesenheit von Zytokincocktail gereiften, *L. monocytogenes*-infizierten, LTA- und LPS-behandelten DZ stark. Unreife DZ führen nur zu einer geringen Stimulierung der T-Zellen (* $p < 0,01$).

Die Aktivität der LTA-behandelten DZ war von der Konzentration der zugegebenen LTA abhängig. Dabei fiel auf, dass zwischen der Aktivität der LTA I- und LTA II-behandelten DZ ein Unterschied vorhanden war. LTA I-behandelte DZ stimulierten T Zellen stärker als LTA II-behandelte. Dieses Ergebnis stimmte mit der Dosis-abhängigen Hochregulierung von Reifemarkern der LTA-behandelten DZ überein. Wie die MLR, zeigte die Durchflusszytometrie eine höhere Aktivität der LTA I gegenüber der LTA II. Im Vergleich zu listeriellen LTA, deren Aktivitätsbereich zwischen 2 - 100 µg/ml lag, wurden funktionelle Veränderungen der DZ durch LPS bereits bei Konzentrationen unter 1 µg/ml beobachtet.

Die Daten weisen auf eine Korrelation zwischen der nachgewiesenen phänotypischen Veränderung und der Steigerung der funktionellen Aktivität der infizierter DZ hin.

5.7 Untersuchung des Zelltods *Listerien*-infizierter DZ

Nachdem gezeigt wurde, dass DZ *L. monocytogenes* effektiv phagozytieren und den größten Anteil der aufgenommenen *Listerien* im Phagosomen abtöten können, stellte sich die Frage, insbesondere in Hinsicht auf Vakzinierungsstrategien, ob DZ die Infektion überleben. Denn nur unter dieser Voraussetzung kann eine Immunantwort induziert werden. Vorarbeiten zeigten, dass *L. monocytogenes*-infizierte murine Makrophagen über Nekrose und infizierte murine DZ über Apoptose sterben (Barsig *et al.*, 1997; Guzman *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurden sowohl Infektions-induzierte Apoptose als auch Nekrose untersucht. Bei allen Versuchen wurden die Ergebnisse mit nicht-infizierten DZ als Negativkontrolle verglichen. Zusätzlich wurden Zellen mit dem Apoptose-Induktor Camptothecin (10 µM) oder mit H₂Odest behandelt. Die so behandelten Zellen dienten als Positivkontrolle für Apoptose bzw. Nekrose. Zuerst wurde zur Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose mit Hilfe der Gel-elektrophoretischen Auftrennung der chromosomalen DNA, DNA-Fragmentierung der infizierten Zellen beurteilt.

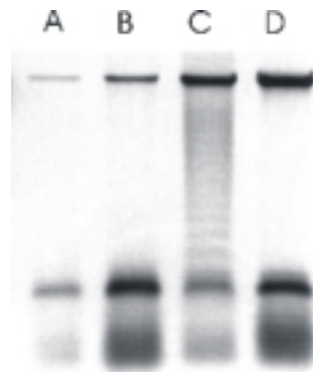


Abb. 29

Chromosomale DNA Agarosegelelektrophorese. Eine spezifische DNA-Fragmentierung ist nur bei Camptothecin-behandelten DZ nachzuweisen.

A. unbehandelte humane Mo-DZ

B. *L. monocytogenes*-infizierte humane Mo-DZ (12 h p.i., MOI 50)

C. Camptothecin-behandelte (12 h, 10 μ M) humane Mo-DZ

D. *L. monocytogenes*-infizierte humane Mo-DZ (12 h p.i., MOI 10)

Gereinigte, eukaryontische DNA von *L. monocytogenes*-infizierten DZ (12 h p.i.) zeigte nach dem Auftragen auf ein Agarose Gel keine für Apoptose typischen DNA-Fragmente einer definierten Basenlängen im Vergleich zur Camptothecin-behandelten DZ (Abb. 29).

Zusätzlich gelang die Beurteilung der Zellmorphologie infizierter DZ mit der TEM, Raster-EM, der Lichtmikroskopie nach Giemsa-Färbung oder der Kernfärbung mit Hoechst 33342. Damit konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* in humanen Mo-DZ nicht die typische apoptotische Morphologie wie Chromatinkondensierung oder Schrumpfung und Fragmentierung der Zelle auszulösen kann (Abb. 30).

Desweiteren ergab die Analyse der normalerweise durch Apoptose gebildeten Nukleosomen, dass *L. monocytogenes*-infizierte DZ im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen keinen signifikanten Unterschied im Zelllysat zeigten. Die Ergebnisse aus diesen verschiedenen Untersuchungsmethoden lassen den Schluss zu, dass die Infektion humaner Mo-DZ mit pathogenen *L. monocytogenes* keine Apoptose in diesen Zellen induziert.

Im Unterschied dazu zeigten Infektionen der DZ mit den beiden Wildtyp Stämmen *L. monocytogenes* EGD und 10403S (Jones und Portnoy, 1994) eine signifikante

($p=0,0001$, Student t-Test) Erhöhung der Nekroserate. Bei einer gewählten MOI von 50 starben bis zu 20% der DZ 6 h p.i. durch Nekrose. Nach 12 h bzw. 24 h war kein weiterer Anstieg der Nekroserate zu beobachten. Im Vergleich dazu lag die Nekroserate nicht-infizierter DZ weit unter 5%.

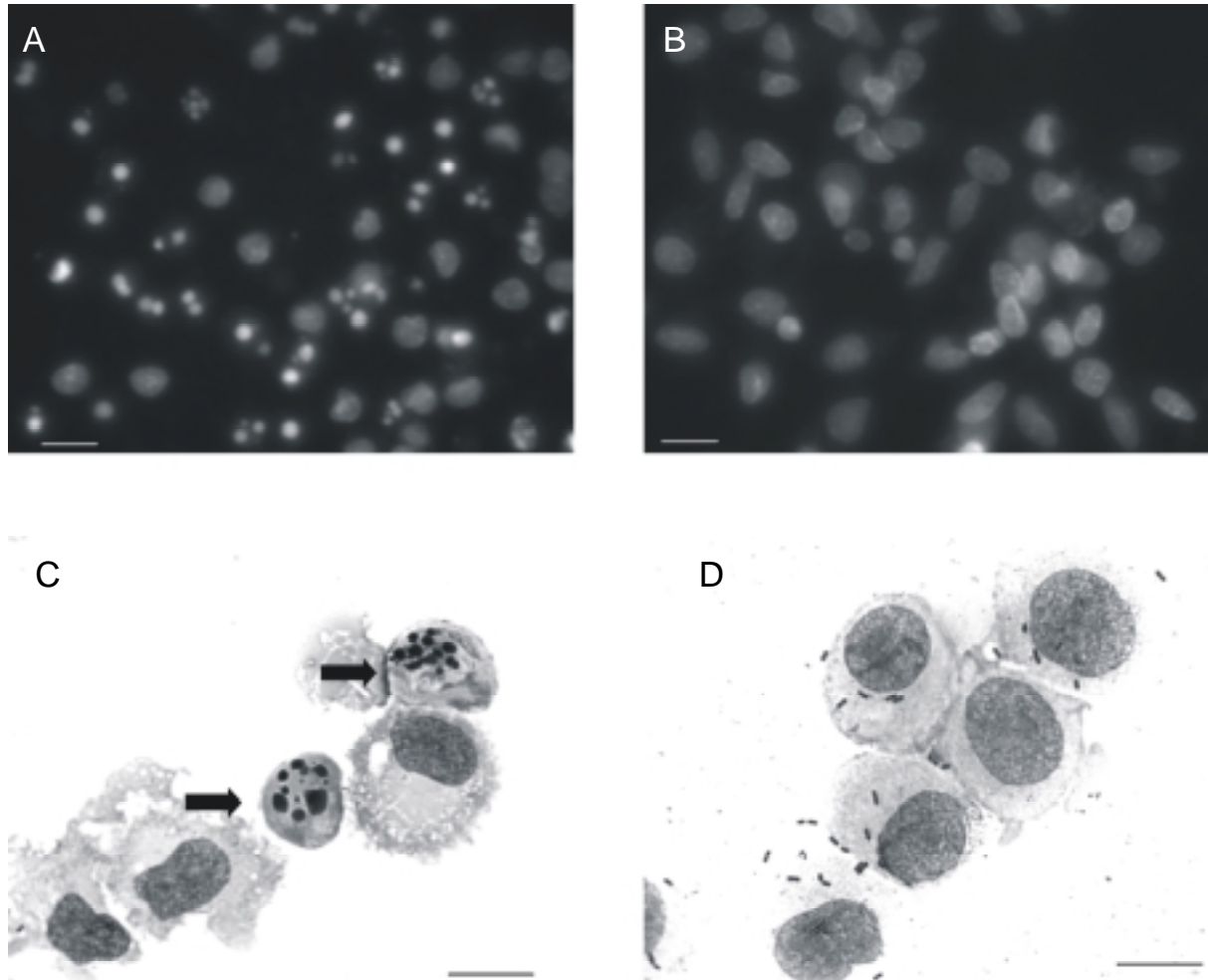


Abb. 30

Beurteilung der Zellkernmorphologie Camptothecin-behandelter (A, C) und *L. monocytogenes*-infizierter humaner Mo-DZ mit Hilfe der Hoechst-Kernfärbung (A, B) und der Giemsa-Färbung (C, D) (6 h p.i., MOI 50; Balkenlänge 10 μm). Camptothecin-behandelte DZ zeigen deutlich apoptotische Kernveränderungen, wohingegen die Zellkernmorphologie der infizierten DZ sich unauffällig darstellt.

Die Nekroserate wurde sowohl mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Propidium-Iodid Färbung (1 $\mu\text{g/ml}$, 2 min) der Zellen, als auch über die Bestimmung der Nukleosomen im Zellkulturüberstand, was zumindest in den ersten Stunden p.i. die Nekroserate widerspiegelt, ermittelt. Die Anzahl an toten DZ nach erfolgter Infektion war von der eingesetzten MOI abhängig (Abb. 31).

Der nachgewiesene Anstieg der Nekrose könnte auf der einen Seite durch die Anwesenheit von extrazellulären *Listerien* und/oder ihrer metabolischen Produkte im Zellkulturmedium bedingt sein. Andererseits könnte die Aufnahme von Bakterien für diese Steigerung erforderlich sein. Um dies zu testen, wurden die listerielle Phagozytose durch Vorbehandlung der DZ mit Cytochalasin D (2 µg/ml) gehemmt. Unter dieser Bedingung zeigte die Infektion mit beiden unterschiedlichen Wildtypen von *L. monocytogenes* eine geringe Nekroserate, die mit der nicht-infizierten, Cytochalasin D behandelten Kontrolle vergleichbar war (Abb. 31).

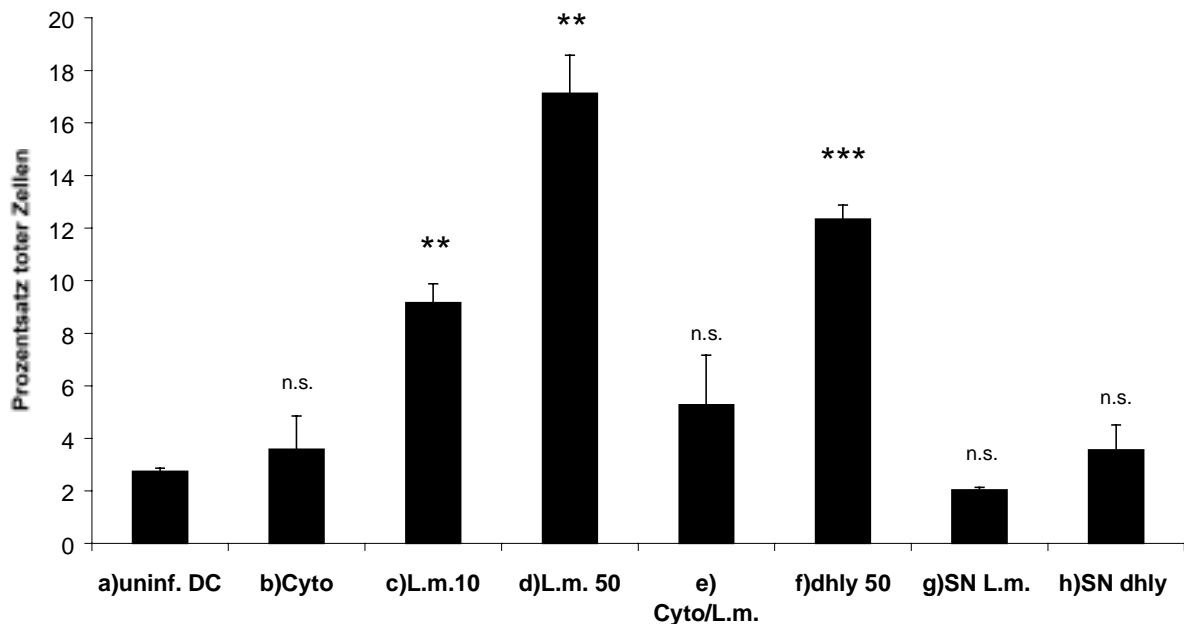


Abb. 31

Bestimmung des Prozentsatz toter DZ 6 h p.i. mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Propidium Jodid-Färbung.

(a) nicht-infizierte DZ (b) Cytochalasin D-behandelte (2 µg/ml) DZ (c) *L. monocytogenes*-infizierte DZ (MOI 10) (d) *L. monocytogenes*-infizierte DZ (MOI 50) (e) *L. monocytogenes* Infektion nach Vorbehandlung der DZ mit Cytochalasin D (2 µg/ml) (f) *L. monocytogenes* Δhly -infizierte DZ (MOI 50) (g) Zugabe von 20% *L. monocytogenes* Bakterienzellkulturüberstand (h) Zugabe von 20% *L. monocytogenes* *Dhly* Bakterienzellkulturüberstand.

Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten dar (n.s.= nicht signifikant; * p < 0,01; ** p < 0,001).

Um listerielle Faktoren zu analysieren, die an der Auslösung des zytotoxischen Effekts beteiligt sind, wurden Versuche mit der *hly*-Deletionsmutante vom 10403S

Listerienstamm durchgeführt. Diese Mutante ist nicht in der Lage, Listeriolysin zu produzieren. Listeriolysin ist für die Lyse der phagosomalen Vakuole und die Befreiung der *Listerien* ins Zytoplasma verantwortlich. Im Vergleich zum Wildtyp löste diese Mutante eine geringere, jedoch nicht signifikante Nekroserate aus (Abb. 31). Um zu überprüfen, ob diese geringfügige Differenz durch einen direkten zytotoxischen Effekt von Listeriolysin erklärt werden kann, wurde der hämolytische Bakterienkulturüberstand des Wildtyps und der nicht-hämolytischen Überstand der Δhly Mutante zu der humanen DZ-Zellkultur dazugegeben (bis zu 20% vom Zellkulturmedium). Die hämolytische Aktivität beider Überstände wurde mit Hilfe von Schafserythrozyten kontrolliert. Dafür wurden die gewaschenen Schafserythozyten mit den beiden Zellkulturüberständen für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Erythrozyten konnte man an der Farbe des Überstands die Hämolyseaktivität bestimmen. Der Wildtyp-ÜS führte zu einer roten Verfärbung wohingegen der Bakterien ÜS von der Δhly Mutante klar blieb. Dennoch induzierte weder der ÜS vom Wildtyp noch der von der Mutante in DZ Zelltod (Abb. 31). Zusammengefasst ist für den Anstieg der Nekroserate die Aufnahme der *Listerien* in die DZ erforderlich. Extrazelluläres Listeriolysin im Zellkulturmedium scheint nicht für die erhöhte Nekroserate verantwortlich zu sein.

5.8 Eukaryontische Antigenexpressionsvektoren gelangen mit Hilfe von Bakterien in humane Mo-DZ

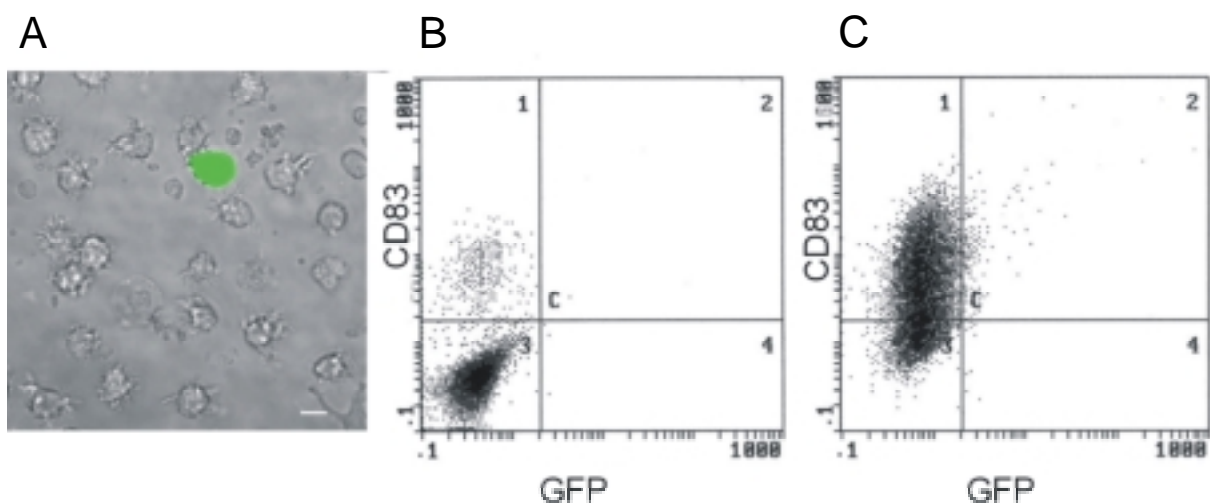


Abb. 32

A. GFP-Expression in humanen DZ nach Infektion mit *L. monocytogenes* $P_{CMV}gfp P_{actA}$ Ply118 (24 h p.i., MOI 50, Balkenlänge 10 μ m)

zu Abb. 32

B. C. Durchflusszytometrie der Oberflächenmarkerexpression von CD83 (y-Achse, logarithmisch) und GFP-Expression (x-Achse, logarithmisch) von nicht-infizierten DZ (B) und *L. monocytogenes* p3LGFP118 infizierten (C) DZ. Doppelt positive Zellen (1%) befinden sich im 2. Quadrant.

5.8.1 *L. monocytogenes* als Träger von eukaryontischen Expressionsvektoren

Nachdem gezeigt wurde, dass DZ *Listerien* effizient aufnehmen, durch die Phagozytose in einen reifen Funktionszustand gelangen und die Zellen die Infektion größtenteils überleben, wurden Versuche mit *L. monocytogenes* als Träger von eukaryontischen Antigenexpressionsvektoren durchgeführt. Wie erwartet, führte die Infektion mit *L. monocytogenes* $P_{CMV}gfp$ P_{actA} Ply118 zu einer Ausreifung der DZ. Interessanterweise war die rasche Lyse der *Listerien* im Phagosom der DZ nicht nachteilig für die Freisetzung des Plasmids. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass bis zu 1% der DZ nach Infektion mit *L. monocytogenes*, die das Plasmid p3LGFP118 tragen, GFP exprimieren (Abb. 32).

5.8.2 *S. typhimurium* und *Y. enterocolitica* als Träger von eukaryontischen Expressionsvektoren

Nachdem gezeigt werden konnten, dass *S. typhimurium* und *Y. enterocolitica* als Vertreter Gram-negative Bakterien nach Infektion von DZ ebenso wie *L. monocytogenes* Reifung in den Zellen auslösen kann, wurden diese Bakterien mit dem eukaryontischen Expressionsvektor transformiert. Sowohl *S. typhimurium* als auch *Y. enterocolitica* wurden mit dem 1 µg p3LGFP118 durch Elektroporation transformiert. Dabei gelang die Transformation von *S. typhimurium* nur über eine zwischengeschaltete Transformation von *Salmonella* LB 5000. Obwohl die Bakterien nicht in der Lage waren, sich aus dem Phagosom zu befreien, zeigte die Infektion mit diesen Bakterienstämmen auch eine eukaryontische Expression von GFP. Interessanterweise war somit die zytoplasmatische Freisetzung des Plasmids nicht unbedingt erforderlich. Die Anzahl an fluoreszierender DZ lag mit Werten zwischen 0,05% und 0,1% jedoch deutlich niedriger als beim Einsatz von *L. monocytogenes* $P_{CMV}gfp$ P_{actA} Ply118 (Abb.33).

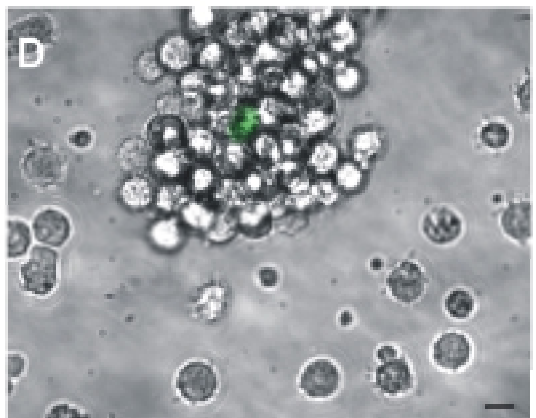
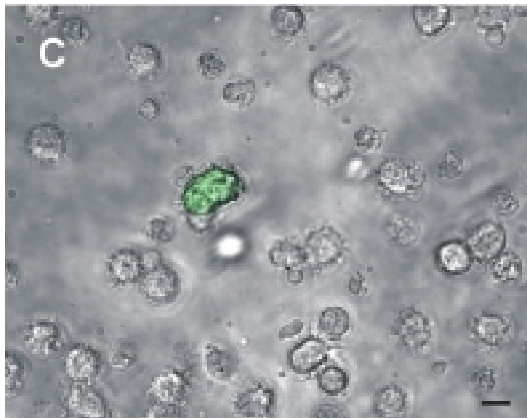
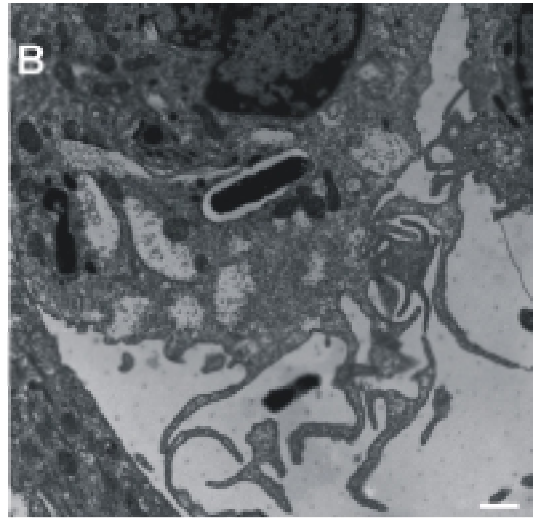
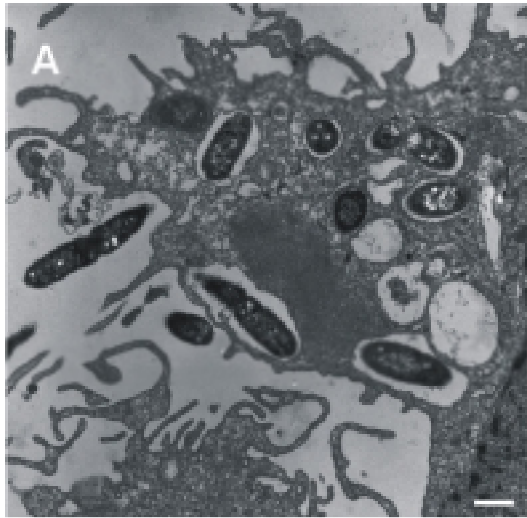


Abb. 33

A. TEM Aufnahmen von phagozytierten *S. typhimurium* und *Y. pseudotuberculosis* in humane DZ (1 h p.i., MOI 10; Balkenlänge 1,1 μm)

B. GFP-Expression humaner Mo-DZ nach Infektion mit *S. typhimurium* p3LGFP und *Y. pseudotuberculosis* p3LGFP (40 h p.i., MOI 50, Balkenlänge 10 μm).

6 Diskussion

Mit dieser Arbeit konnten grundlegende Erkenntnisse zur Interaktion von DZ mit *L. monocytogenes* gewonnen werden, die insbesondere für zukünftige Vakzinierungsstrategien von DZ mit *L. monocytogenes* von Bedeutung sind. In der Vergangenheit bestand die Schwierigkeit, eine größere Anzahl an frisch isolierten DZ zu gewinnen; ebenso verhinderte das Fehlen von spezifischen DZ Markern umfangreichere Untersuchung der Interaktionen von DZ und Mikroorganismen. DZ können nun in ausreichender Anzahl aus humanen Blutmonozyten unter Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 gebildet werden und entsprechen in vielen Eigenschaften primären DZ (Bender *et al.*, 1996; Romani *et al.*, 1996). Diese humanen Mo-DZ befinden sich nach siebentägiger Kultur im Stadium der unreifen DZ und können sich unter Zugabe von Reifungsstimuli nach weiteren 2-3 Tagen zu reifen DZ entwickeln.

6.1 *L. monocytogenes* wird in humane Mo-DZ aufgenommen

In der vorliegende Arbeit konnte mit unterschiedlichen Nachweismethoden gezeigt werden, dass unreife, humane Mo-DZ das Gram-positive Bakterium *L. monocytogenes* effizient aufnehmen. Im Unterschied zu einer Reihe von nicht professionell phagozytischen Zellen, bei denen die listeriellen Internaline A und B für die Aufnahme von *L. monocytogenes* essentiell sind (Drevets *et al.*, 1995; Mengaud *et al.*, 1996, Greiffenberg *et al.*, 1998), spielen diese beiden Internaline bei Mo-DZ keine Rolle. Die Aufnahme erfolgt durch Phagozytose, da sowohl die *inIAB* Deletionsmutante, als auch tote *Listerien* und die nicht-pathogenen *L. innocua* in gleichem Maße wie die virulenten *L. monocytogenes* von Mo-DZ internalisiert werden. Der Aufnahmeprozess von *L. monocytogenes* in eine murine dendritische Milzzelllinie verläuft ebenso unabhängig von Internalin A und B (Guzman *et al.*, 1995).

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte der Aufnahmeprozess näher analysiert werden. *L. monocytogenes* werden von dünnen Membranausläufern der Mo-DZ eingehüllt, die das Bakterium eng umschließen. Dieser Phagozytoseprozess erinnert an einen „Zipper“-ähnlichen Mechanismus (Mengaud *et al.*, 1996), der ohne sichtbare morphologische Veränderungen der Oberfläche der Wirtszelle abläuft.

6.2 Anti p60-Antikörper beeinflussen die Phagozytose von *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ

Die Aufnahme von *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ ist abhängig von humanem Plasma, das Immunglobuline und Komplementfaktoren enthält. Für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Makrophagen konnte ebenso eine Abhängigkeit von hitzelabilen Serumfaktoren nachgewiesen werden (Harrington-Fowler *et al.*, 1981).

Die effiziente Aufnahme der *Listerien* durch DZ in Anwesenheit von humanem Plasma kann weder durch die Zugabe von FCS noch durch humanes Serumalbumin ersetzt werden. Der Zusatz von gepoolten Immunglobulinen führte jedoch zu einer Aufnahmerate, die mit der bei Anwesenheit von humanem Plasma vergleichbar war. Somit ist anzunehmen, dass Immunglobuline als Opsonin von *L. monocytogenes* für eine Aufnahme in Mo-DZ über den FC- γ -Rezeptor entscheidend sind. DZ exprimieren unterschiedliche Rezeptoren, die den FC-Anteil der Immunglobuline binden und somit die Internalisierung Immunglobulin-Antigenkomplexen bewirken können (Fanger *et al.*, 1996; Regnault *et al.*, 1999).

Western-Blot Analysen zeigten in allen getesteten humanen Seren/Plasmen und in den kommerziell erhältlichen, gepoolten, humanen Immunglobulinen Antikörper gegen das extrazelluläre, 60 kDa Protein von *L. monocytogenes* (p60). Die Präadsorption der Immunglobuline mit p60 produzierenden *L. monocytogenes* Stamm und die Verwendung einer *iap* Deletionsmutante, welche kein p60 produziert, zeigte, dass anti-p60-Antikörper als vorherrschende listerielle Opsonine für eine FC-vermittelte Phagozytose dienen. Alle *Listerien* Spezies produzieren p60-ähnliche Proteine. p60 Proteine von apathogenen *Listerien* besitzen die gleichen B-Zell Epitope wie die von virulenten *L. monocytogenes* (Bubert *et al.*, 1992). Da diese nicht-pathogenen *Listerien* weit verbreitet in der Umwelt vorkommen, sind Menschen diesen Mikroorganismen ständig ausgesetzt (Geginat *et al.*, 1999). p60 ist ein starkes Immunogen und wird von allen *Listerien*stämmen konstitutiv exprimiert. Demnach sind p60-spezifische Antikörper, die in Plasmen von immunkompetenten Menschen nachgewiesen werden, wahrscheinlich auf den Kontakt mit *L. innocua* und anderen apathogenen *Listerien* Spezies zurückzuführen. Diese kreuzreagierenden p60 Antikörper im humanen Plasma können *L. monocytogenes* opsonisieren und somit die Aufnahme des pathogenen Bakteriums in humane Mo-DZ fördern. Die FC-

Rezeptor vermittelte Aufnahme könnte bei enteralen DZ, die sich in den Peyer Plaques befinden, eine wichtige Rolle spielen (Kelsall und Strober, 1996). Da *Listerien* über die Darmmukosa in den Wirt eindringen, könnte die Aufnahme über listerielle anti-p60 IgA in diese DZ getriggert werden. So wäre ein Einfluss der listeriellen Antikörper *in vivo* auf den Infektionsverlauf denkbar. *L. monocytogenes* wird nach Aufnahme in den DZ abgetötet (Kolb-Mäurer *et al.*, 2000). Der Mechanismus der effizienten Phagozytose durch die Anwesenheit von anti-p60 Antikörpern könnte somit eine Verbreitung von *L. monocytogenes* über den Blutstrom verhindern und so für die niedrige Inzidenz der humanen Listerienerkrankung verantwortlich sein.

Zusätzlich wurden in einigen Plasmen Antilisteriolysin Antikörper und andere *Listerien*-spezifische Antikörper entdeckt. Antilisteriolysin Antikörper scheinen jedoch als Opsonin für eine FC-bedingte Phagozytose von *L. monocytogenes* eine geringere Bedeutung zu haben, da es nach Zugabe der *hly* Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp nur zu einer geringfügigen Reduktion der Aufnahme führte. Wie beim Wildtyp war ein deutlicher Unterschied der listeriellen Aufnahmerate bei der An- und Abwesenheit von humanem Plasma festzustellen. Dennoch werden auch andere listerielle Antikörper, die in geringeren Konzentrationen im humanen Plasma vorhanden sind, die Aufnahme von *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ induzieren können.

Sallusto und Kollegen wiesen 1995 darauf hin, dass der Mannose Rezeptor, der auf DZ exprimiert wird, eine Rolle für die Aufnahme von Fremdpartikeln spielen könnte. In den Invasionsstudien wurde jedoch durch die Zugabe von löslichem Mannan die Aufnahme von *L. monocytogenes* nicht verhindert. Es ist ebenfalls bekannt, dass murine Makrophagen Komplement-opsonisierte *L. monocytogenes* über die Komplementrezeptoren C3b und C1q binden (Alvarez-Dominguez *et al.*, 1993; Drevets und Campbell, 1991). DZ tragen C3b Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (Banchereau und Steinman, 1998). C3b kann durch listerielle Zellwandfragmente über den alternativen Komplementaktivierungsweg auf der Oberfläche der Bakterien binden und somit als Opsonin wirken (Harrington-Fowler *et al.*, 1981). Für die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Mo-DZ scheinen Komplementrezeptoren jedoch eher von untergeordneter Bedeutung zu sein, da Hitzeinaktivierung zu keiner

statistisch signifikanten Reduktion der Aufnahme geführt hat. Gegen eine Komplementrezeptor-induzierte Aufnahme spricht auch, dass die Vorbehandlung DZ mit Cytochalasin B, das die *de novo* Aktinpolymerisation stört, die Aufnahme von *Listerien* in humane Mo-DZ verhindert. Ein intaktes Aktinzytoskelett ist somit für die effiziente Aufnahme essentiell, wobei Aktinmikrofilamente für einen Phagozytosemechanismus über den C3 Rezeptor weniger entscheidend sind. Im Unterschied dazu sind Aktinfilamente für eine FC-Rezeptor ausgelöste Phagozytose essentiell (Kaplan, 1977). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese einer Immunglobulin-induzierten Aufnahme von *L. monocytogenes* über FC-Rezeptoren der DZ, wobei der FC γ -Rezeptor I (CD64) als auch der FC γ Rezeptor II (CD32) und III (CD16) auf humanen DZ eine Rolle spielen kann (Fanger *et al.*, 1996). Ein Beweis einer FC-Rezeptor induzierten Aufnahme konnte über eine Blockierung der FC γ RIII Rezeptoren durch anti-CD16 Antikörper geführt werden. Obwohl auf der Zelloberfläche unreifer, humaner Mo-DZ nur eine sehr geringe Anzahl an FC γ RIII zu finden ist (Rieser *et al.*, 1998), konnte bei Anwesenheit von anti-CD16 Antikörpern eine deutliche Reduktion der Aufnahmerate nachgewiesen werden.

Eine Bindung von Antigenen an FC-Rezeptoren führt zur DZ Aktivierung und Antigenpräsentation über MHC Klasse II (Fanger *et al.*, 1997; Regnault *et al.*, 1999), Dadurch ist es anzunehmen, dass die Bindung von Antikörper-opsonisierten *L. monocytogenes* für die effiziente Reifung der infizierten DZ und die Hochregulierung von MHC Klasse II mitverantwortlich ist. Interessanterweise gelangen Immunglobulin-gekoppelte Antigene bevorzugt in den alternativen MHC Klasse I Präsentationsweg (Regnault *et al.*, 1999).

Eine Opsonisierung von Mikroorganismen mit spezifischen Immunglobulinen nimmt durch den Phagozytoseprozess über den FC-Rezeptor Einfluss auf den intrazellulären Verlauf. Immunglobulin-opsonisierte Toxoplasmen befinden sich nach Aufnahme im Phagosom. Im Unterschied dazu dringen nicht-opsonisierte *T. gondii* aktiv in die Phagozyten ein und gelangen in ein Kompartiment, welches weder endosomale noch phagosomale Eigenschaften besitzt (Mordue und Sibley, 1997). Im Vergleich zu Antikörper-opsonisierten *E. coli*, die im Phagosomen von Makrophagen getötet werden, überleben nicht Immunglobulin-gebundene *E. coli* im Wirtszellphagosom, das unter diesen Bedingungen weniger Superoxid Radikale

enthält (Baorto *et al.*, 1997). Die Opsonisierung mit Immunglobulinen ist somit für das weitere intrazelluläre Schicksal der Mikroorganismen von großer Bedeutung.

Im Unterschied zu *L. monocytogenes* wurde die Aufnahme von *S. typhimurium* und *Y. enterocolitica* durch die Anwesenheit von humanem Plasma nicht gesteigert, obwohl Antikörper gegen Oberflächenkomponenten dieser Pathogene in den getesteten Plasmen nachweisbar waren. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass sich die Aufnahme der beiden Gram-negativen Bakterien durch Mo-DZ von der Phagozytose von *L. monocytogenes* unterscheidet. Für die Aufnahme von *Listerien* konnte gezeigt werden, dass FC-Rezeptoren auf humanen DZ eine entscheidende Rolle spielen. DZ besitzen neben den FC-Rezeptoren, andere Phagozytoserezeptoren, wie z.B. der Mannose-Rezeptor (Banchereau und Steinman, 1998). Dieser und andere, zum Teil noch unbekannte Rezeptoren, könnten für die Aufnahme von Salmonellen und Yersinien eine Rolle spielen.

Die in der Literatur beschriebenen Studien zur Invasion verschiedener Bakterien in DZ zeigen, dass bei der Durchführung der Experimente unterschiedliche Bedingungen gewählt wurden. Cortini und Kollegen (1999) benutzten während der Inkubation der unreifen DZ mit *Streptococcus gordonii* 10% FCS. In der Anwesenheit von FCS wurde *S. gordonii* 2 h p.i. nur in einer geringen Anzahl in DZ (< 20%) über konventionelle Phagozytose aufgenommen. Erst nach einer Infektionszeit von 18 h wurden in mehr als 90% der Zellen Bakterien entdeckt. Filgueira und Kollegen (1996) kultivierten humane Mo-DZ in 5% hitzeinaktiviertem, gepooltem, humanem Serum der Blutgruppe A und inkubierten diese Zellen mit *Borrelia burgdorferi*. Unter diesen Bedingungen wurde eine Infektionsrate von über 50% der DZ erreicht.

Henderson *et al.* (1997) hielt es für unwahrscheinlich, dass eine Opsonisierung von *Mycobacterium tuberculosis* für den Internalisierungsprozess in humane Mo-DZ eine Rolle spielt. Die Arbeitsgruppe inkubierte *M. tuberculosis* über Nacht in Serum-freiem Medium. Nach diesem Zeitraum waren 50-70% der DZ infiziert. Im Unterschied dazu beschreibt Larsson *et al.* (1997), dass *M. tuberculosis* für eine effiziente Phagozytose zuvor opsonisiert werden muss.

Unsere Invasionsuntersuchungen zeigen zusammen mit den Ergebnissen aus der Literatur, dass abgesehen von den unterschiedlichen Bakterien, das verwendete Zellkulturmedium während der Inkubation für die bakterielle Aufnahme in humane

Mo-DZ entscheidend ist. Unterschiedliche Invasionsergebnisse können darin begründet liegen.

6.3 *L. monocytogenes* wird im Phagosom der humanen MO-DZ abgetötet

Mit Hilfe der TEM konnte bereits nach 3 h p.i. beobachtet werden, dass die Mehrheit der Bakterien im Phagosom der DZ verbleibt. Nur in weniger als 5% der infizierten DZ gelang es den *Listerien*, sich aus dem Phagosom in das Zytosol zu befreien.

Die Untersuchungen von *L. monocytogenes*-infizierten, humanen Monozyten und Makrophagen ergaben ähnliche Ergebnisse (Peck, 1985; Biroum-Noerjasin, 1977). Wie humane Mo-DZ besitzen diese Zellen bakterizide Eigenschaften. Die Wirkung dieser Zellen wurde durch die Anwesenheit von IFN- γ noch gesteigert. Die Aktivität der phagozytischen Zelle bestimmt somit, ob internalisierte Mikroorganismen im Phagosomen überleben oder abgetötet werden.

Auch andere Studien zeigen, dass Bakterien im Phagosom der DZ abgetötet werden. Ojcius und Kollegen (1998) infizierten eine murine DZ Linie (D2SC/1) mit zwei unterschiedlichen *Chlamydien* Spezies. Sie beobachteten, dass die Bakterien relativ unspezifisch über Makropinozytose in die DZ Linie aufgenommen werden. In der Zelle fusionierten anschließend die aufgenommenen Makropinosomen mit MHC Klasse II exprimierenden Lysosomen. Vergleichbar mit der Lyse der internalisierten *L. monocytogenes* in humanen DZ, wurden die aufgenommenen *Chlamydien* im Phagosom der murinen DZ abgetötet. Die durch Zecken übertragene Spirochäten *Borrelia burgdorferi* werden regelrecht von humanen, dermalen DZ und Blut-DZ verschlungen (Filgueira *et al.*, 1996). Die internalisierten Bakterien befinden sich sowohl frei im Wirtszellzytosol als auch innerhalb von Phagolysosomen der DZ. Intravesikuläre Borrelienantigene kolokalisieren mit MHC Klasse II Molekülen. Human Mo-DZ internalisieren *S. gordonii* über konventionelle Phagozytose. Wie bei *L. monocytogenes* beobachtet, befinden sich *S. gordonii* im Phagosom der Zelle in unterschiedlichen Stadien der Degradierung (Cortini *et al.*, 1999).

Obwohl die TEM die Aufnahme von *L. monocytogenes* in Mo-DZ verifiziert, kann mit dieser Methode keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten *Listerien* vorgenommen werden. Durch Anwendung eines *gfp*-exprimierenden *L. monocytogenes* Stamm (Dietrich *et al.*, 1998) werden lebendige *Listerien* im Zytosol der DZ mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Dabei steht *gfp* unter der

transkriptionellen Kontrolle eines *actA*-Promotors. Dieser Promotor ist hoch aktiv nachdem die *Listerien* sich ins Zytoplasma der Wirtszelle befreit haben. Aus diesem Grund beweist eine GFP Expression unter der Kontrolle des *actA*-Promotors die Anwesenheit der *Listerien* im Zytoplasma der DZ. Eine GFP-Expression durch *L. monocytogenes* führt zur Akkumulation des Proteins im bakteriellen Zytoplasma, eine Freisetzung des GFPs in das Wirtszellzytosol ist nicht zu beobachten. Experimente mit diesem *Listerien*stamm zeigten frühestens 4 h nach Infektion der Mo-DZ fluoreszierende Bakterien. Dies entspricht der Zeit, die *Listerien* benötigen, um sich aus dem Phagosomen zu befreien, den *actA*-Promotor zu aktivieren und schließlich GFP zu produzieren. Im Unterschied zur elektronenmikroskopischen Beobachtung und der Mikroskopie nach Giemsa-Färbung, die zeigte, dass beinahe alle Mo-DZ *Listerien* internalisiert haben, besaßen durchschnittlich 5% der infizierten Mo-DZ fluoreszierende Bakterien. Ähnlich niedrige Zahlen wurden mit der Bestimmung der CFU beobachtet. Bei dieser Methode können ebenso wie mit GFP-exprimierenden *L. monocytogenes* Stämmen nur lebendige *Listerien* erfasst werden. Die Anzahl an *Listerien*-infizierten DZ entsprach 1 h p.i. nach Lyse der DZ 20% der Gesamtzahl der DZ. Im folgenden Zeitverlauf nahm die Anzahl der CFU stark ab. Vergleichbar mit diesen Ergebnissen, wurde eine Abnahme der Lebendzellzahl von *S. typhimurium* und noch ausgeprägter von *E. coli* in Mo-DZ nach dem Ausplattieren der lysierten DZ 6 h p.i. beobachtet (Schoppet *et al.*, 2000).

Im Unterschied zur effizienten Aufnahme von *L. monocytogenes* durch humane Mo-DZ, die mit Hilfe der TEM und der Lichtmikroskopie nach Giemsa-Färbung gezeigt wurde, spricht die geringe Anzahl an lebenden Bakterien in DZ und die wenigen GFP-exprimierenden *Listerien* dafür, dass es nur einer Minderheit der internalisierten *Listerien* gelingt, sich ins Zytoplasma der DZ zu befreien. Die starke Verringerung der lebenden Bakterien innerhalb der ersten Stunden nach Inkubation ist somit am wahrscheinlichsten der phagosomalen, bakteriziden Wirkung der DZ zuzuschreiben. Guzman und Kollegen zeigten 1995, dass *L. monocytogenes* von murinen Milz DZ aufgenommen werden. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen mit humanen Mo-DZ können sich die *Listerien* jedoch aus dem Phagosom der murinen Milz DZ effizient befreien und sich von einer Zelle zur nächsten ausbreiten (Guzman *et al.* 1995). Das dennoch beobachtete Absinken der CFU führten die Autoren auf ein Sterben der infizierten DZ zurück. Die freigesetzten *Listerien* werden durch das extrazellulär vorhandene Antibiotikum abgetötet.

6.4 *L. monocytogenes*-infizierte DZ reifen zu immunstimulatorischen Zellen heran

Die Aufnahme von *L. monocytogenes* in humane Mo-DZ resultiert in einem veränderten Phänotyp der DZ. In der Literatur ist beschrieben, dass DZ in wenigstens zwei unterschiedlichen Funktionsstadien vorkommen. Unreife DZ sind durch eine hohe Antigenaufnahme und Prozessierungseigenschaft gekennzeichnet. Ihre Fähigkeit, ruhende T-Zellen zu stimulieren, ist gering ausgeprägt. Reife DZ hingegen, weisen hohe T-Zell stimulatorische Eigenschaften auf (Rescigno *et al.*, 1999). Nach Infektion mit *L. monocytogenes* verändert sich sowohl die Oberflächenmolekülexpression als auch die Morphologie der unreifen DZ hin zum Funktionszustand der reifen DZ. So wurde die Membranexpression von CD83, MHC Klasse II und CD86 durch die Infektion hochreguliert. Beinahe alle DZ exprimierten nach Inkubation mit *L. monocytogenes* CD83, ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie und Reifephase-Marker mit noch unbekannter Funktion (Zhou und Tedder, 1995). Neben dem Wildtyp, führte auch die Infektion der DZ mit apathogenen *Listerien* zur Reifung. Die phänotypischen Veränderungen der infizierten DZ gingen mit einer gesteigerten funktionellen Aktivität hinsichtlich der Stimulierung allogener, naiver T-Zellen einher.

Listerien besitzen damit eine ähnlich stark ausgeprägte Effizienz wie die Zugabe inflammatorischer Zytokine, eine Reifung von DZ zu induzieren. Die Inkubation mit anderen Bakterien geht ebenso mit einer Ausreifung von DZ einher. Sowohl LPS-enhaltende, Gram-negative als auch LPS-freie, Gram-positive Bakterien gelten als potente Induktoren der DZ Maturierung (Filgueira *et al.*, 1996; Winzler *et al.*, 1997; Henderson *et al.*, 1997; Cortini *et al.*, 1999; Reis e Sousa *et al.*, 1999).

Dabei können Bakterien direkt oder indirekt über Zytokinfreisetzung wie TNF und IL-1 am Reifungsprozess beteiligt sein. Obwohl einige bakterielle Effekte auf die Ausreifung der DZ indirekt verlaufen, ist es wahrscheinlich, dass eine Reihe von Rezeptoren auf der Oberfläche DZ am Erkennen von Mikroorganismen und an der nachfolgenden Zell-Aktivierung beteiligt sind. Toll-ähnliche Rezeptoren erkennen wie der CD14 Rezeptor eine große Anzahl bakterieller Zellwandkomponenten. Sie sind an der Signalübertragung sowohl von LPS als auch von LTA beteiligt (Kopp und Medzhitov, 1999; Schwandner *et al.*, 1999).

6.5 Listerielle LTA: Faktor zur Reifung DZ

Untersuchungen mit Hilfe des Doppel-Kammer Systems, bei dem Zellen durch eine Membran voneinander getrennt werden können, ergaben, dass die Reifung der DZ nach Inkubation mit *Listerien* nur zum Teil von der Phagozytose der Bakterien abhängt. Die alleinige Anwesenheit von listeriellen Produkten ($< 0,2 \mu\text{m}$) genügte, um zumindest in einem Teil der DZ eine Reifung zu bewirken. Auf der Suche nach Komponenten auf der Oberfläche von *Listerien*, wurde listerielle LTA auf die Fähigkeit getestet, Reifung von DZ zu induzieren. Alle Reifungseffekte nach Infektion der DZ mit dem kompletten Bakterium ließen sich durch die Zugabe von listerieller LTA nachahmen. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass listerielle LTA eine entscheidende Rolle bei der *Listerien*-induzierten DZ Reifung spielt, wobei sich für die zwei LTA-Fraktionen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Aktivität ergaben. Primäre murine Knochenmarksmakrophagen werden auch durch LTA aktiviert (Keller *et al.*, 1992). In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass listerielle LTA in P338D₁ Makrophagen zu einer NF- κ B Aktivierung führt (Hauf *et al.*, 1997). Im Unterschied dazu zeigte diese Studie jedoch, dass LTA II die aktive Fraktion darstellt. Diese Differenz wäre durch unterschiedliche Rezeptoren für listerielle LTA auf humanen Mo-DZ und den murinen Makrophagen zu erklären. LTA kann von einigen Wirtszellen über den Toll-ähnlichen Rezeptor 2 (TLR 2) erkannt werden (Schwandner *et al.*, 1999). Über diesen Rezeptor können Gram-positive Bakterien Monozyten aktivieren (Flo *et al.*, 2000). Neben TLR 2 ist eine Bindung von LTA an CD14 beschrieben worden (Cleveland *et al.*, 1996). Zusätzlich ist bekannt, dass TLR 2 vermittelte Signaltransduktion durch eine Koexpression von CD14 erleichtert wird. Obwohl Mo-DZ auf ihrer Oberfläche kaum CD14 exprimieren, kann lösliches CD14 im Plasma für die stimulierende Eigenschaft von LPS auf humanen DZ verantwortlich sein (Verhasselt *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass eine Adsorption von CD14 einen geringeren Effekt von listerieller LTA auf die DZ Maturation zu Folge hat. Lösliches CD14 ist wahrscheinlich an der LTA bedingten Aktivierung der DZ beteiligt.

Neben der Reifungsinduktion durch listerielle LTA, führte auch die Zugabe von chromosomaler, listerieller DNA zur Stimulierung der DZ. Der Reifungseffekt wurde durch einen Abbau der DNA reduziert. Es ist bekannt, dass bakterielle DNA und immunstimulatorische CpG Oligonukleotide Reifung und Aktivierung von DZ induzieren können (Sparwasser *et al.*, 1998). Somit könnte die Aktivierung der Mo-

DZ, die nach Trennung der Zellen von den Bakterien über eine Membran (Porengröße 2 µm) beobachtet wurde, sowohl durch listerielle LTA als auch durch freigesetzte DNA von abgestorbenen *Listerien* vermittelt werden.

6.6 DZ überleben Infektion mit *L. monocytogenes*

Die Mehrheit der internalisierten *Listerien* wurde im Phagosom abgetötet. Nach Infektion mit dem Wildtyp starben ca. 20 % der infizierten DZ durch Nekrose. Die Nekroserate war abhängig von der gewählten MOI. Bei Infektionsversuchen mit der *hly* Deletionsmutante zeigte sich eine verringerte Nekroserate. Diese könnte einerseits durch den fehlenden Austritt der *hly* Mutante aus dem Phagosom bedingt sein. Andererseits könnte die erhöhte Nekrose beim Wildtyp direkt durch die Anwesenheit von Listeriolysin induziert werden. Nach Zugabe von Listerienkulturüberstand von *L. monocytogenes* mit hämolytischer Aktivität, zeigte diese DZ Kultur im Vergleich zu nichtinfizierten Kontrollzellen keinen Unterschied hinsichtlich der Nekroserate. Dabei ist jedoch fraglich, ob Listeriolysin bei einem pH von 7.4 im Zellkulturmedium noch Aktivität zeigt. Die Hemmung der Aufnahme durch Cytochalasin D führte nach Infektion zu keinem Anstieg der Nekroserate. Aus diesem Grund scheint der Eintritt der *Listerien* in das Zytosol der DZ für den Anstieg der Nekroserate verantwortlich zu sein. Dennoch bleibt es unklar, inwieweit Listeriolysin im Zytosol der Zelle eine Rolle für die Auslösung des Zelltods besitzt.

Eine Reihe von pathogenen Bakterien, die intrazellulär überleben, aktivieren innerhalb der infizierten Wirtszelle ein apoptotisches Programm (Barsig und Kaufmann, 1997). Die Induktion eines apoptotischen Zelltods durch eine Infektion mit *L. monocytogenes* ist für eine murine DZ Linie beschrieben worden (Guzman *et al.*, 1996). Die Apoptose der murinen DZ wird durch Listeriolysin induziert. Im Unterschied zu dieser Studie sprechen die vorliegenden Daten gegen eine durch *L. monocytogenes* induzierte Apoptose in humanen Mo-DZ. *L. monocytogenes* löst nach Infektion humaner DZ nicht die charakteristischen apoptotischen Kernveränderungen aus. Es konnte weder eine Chromatinkondensierung noch DNA-Fragmentierung beobachtet werden. Decatur und Portnoy (2000) konnten zeigen, dass die Proteinsequenz „PEST“ von Listeriolysin im Zytosol der Wirtszelle für die eigene Degradierung verantwortlich ist. Eine Mutation in dieser Sequenz führt zur Akkumulation von Listeriolysin im Zytosol und damit zum Absterben der Zelle. Um

sich jedoch im Wirt zu verbreiten, sind *Listerien* auf eine lebende Wirtszelle angewiesen. Das zugeführte Listeriolysin zur Zellkultur, das in den Experimenten von Guzman und Kollegen zur Apoptose der murinen DZ führte, könnte durch die fehlende Sequenz, die am Abbau von Listeriolysin beteiligt ist, bedingt sein.

6.7 Dendritische Zellen als Ziel für DNA Vakzinierung

DZ spielen die wichtigste Rolle bei der Aktivierung naiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und bilden die Basis einer effizienten Immunabwehr gegenüber infektiösen Agenzien (Steinman, 1991). Nur eine geringe Anzahl an reifen DZ wird benötigt, um eine potente T-Zell Immunantwort zu induzieren (Rescigno *et al.*, 1999; Esche *et al.*, 1999). Im Hinblick auf die zentrale Rolle DZ in der Kontrolle einer Immunantwort, sind DZ für verschiedene Erkrankungen von großer Bedeutung. Einerseits können sie bei der Auslösung von Allergien und Autoimmunerkrankungen eine pathologische Rolle spielen (Ludewig *et al.*, 1999). Andererseits besitzen DZ bei der Infektions- und Tumorabwehr immunologisch schützende Eigenschaften (Paglia und Guzman, 1998).

Das Prinzip der DNA-Vakzinierung basiert auf dem Transport von eukaryontischen Antigenexpressionsvektoren in APZ (Hassett und Whitton, 1996). Die Methode der DNA-Vakzinierung wurde bereits im Tiermodell genutzt, um eine protektive Immunantwort gegen eine Reihe von Pathogenen und Tumoren auszulösen (Takashima und Morita, 1999). DNA-Vakzine bestehen aus einem Plasmid, mit einem in eukaryontischen Zellen aktiven Promotor, dem antigenkodierenden Gen sowie einer Transkriptionsterminatorsequenz. Die DNA-Vakzinierung führt somit zur Expression von Antigenen in ihrer nativen Form (Donnelly *et al.*, 1997).

DZ kommt bei der DNA-Vakzinierung aus unterschiedlichen Gründen eine besondere Bedeutung zu. Zum einen nehmen DZ die sekretierten Antigene transfizierter Zellen aus der Nachbarschaft auf. Diese Antigene können sie zusammen mit MHC Klasse II effizient CD4⁺ T-Helferzellen präsentieren. Über den alternativen MHC Klasse I Weg ist ebenso eine Präsentation der Antigene zusammen mit MHC Klasse I Molekülen üblich. Außerdem ist die direkte Antigenpräsentation durch eine Transfektion der DZ selbst möglich (Takashima und Morita, 1999).

Die außerordentliche Kapazität DZ eine Immunantwort zu induzieren, hat man sich bereits in der adjuvanten Tumorthherapie zu nutze gemacht. Dazu werden autologe DZ *ex vivo* kultiviert, mit Tumorantigenen beladen und anschließend dem Wirt

reinfundiert. Nach Reinfusion antigenbeladenen DZ kommt es zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort (Zitvogel *et al.*, 1996, Paglia, *et al.*, 1996). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass diese Methode vor Tumoren schützen und zur Größenreduktion manifester Tumoren führen kann (Schuler und Steinman, 1997). Diese sogenannten DZ-Vakzinierungsmethoden wurden bereits anhand von Studien an Tumorpatienten, die z.B. an einem metastasierten Melanom leiden, durchgeführt. Im Hinblick auf die Auslösung einer antitumoralen Antwort sind die ersten Ergebnisse der DZ-Vakzinierung bei Melanompatienten vielversprechend (Nestle *et al.*, 1998, Thurner *et al.*, 1999). Eine Alternative zu dieser *in vitro* Tumorantigen Beladung von DZ stellt die DNA-Vakzinierung dar. Dazu wird, wie oben bereits erwähnt, antigenkodierende DNA direkt in den Wirt eingebracht.

Wegen der geringen Anzahl an antigenpräsentierenden DZ im Muskelgewebe (Hohlfeld und Engel, 1994), sind Alternativen zur direkten intramuskulären Injektion von Plasmid-DNA wünschenswert. Neben viralen und liposomalen DNA-Carriern besteht die Möglichkeit DNA durch attenuierte, intrazelluläre Bakterien zu übertragen (Grillot-Courvalin *et al.*, 1999). Eine effiziente Übertragung antigenkodierender Plasmid-DNA konnte bereits mit attenuierten, intrazellulären Mutanten von *Shigella flexneri* (Sizemore *et al.*, 1995), invasiven *Escherischia coli* (Courvalin *et al.*, 1995) und *Salmonella typhimurium* (Darji *et al.*, 1997; Paglia *et al.*, 1998) beschrieben werden.

Eine Alternative zu den genannten Gram-negativen Bakterien für die Übertragung eukaryontischer Antigenexpressionsvektoren, stellt das LPS-freie, Gram-positive Bakterium *L. monocytogenes* dar. Grundvoraussetzung ist jedoch, dass dieses Bakterium effektiv durch die DZ aufgenommen wird.

Zusammenfassend lässt sich anhand der vorliegenden Arbeit festhalten, dass *L. monocytogenes* effektiv in DZ aufgenommen wird. Darüberhinaus wird durch die Aufnahme der Mikroorganismen eine Reifung der DZ induziert, die mit einer erhöhten Kapazität zur Antigenpräsentation verbunden ist. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *L. monocytogenes* von den DZ überlebt wird. Um eine Immunantwort zu induzieren ist es essentiell, dass DZ durch das Pathogen stimuliert werden und die Infektion überleben. Sterben hingegen die infizierten DZ ab oder regulieren sie ihre kostimulatorischen Signale herunter, misslingt es ihnen, ruhende

T-Zellen zu aktivieren. Damit ist eine rationale Grundlage gegeben, Vakzinierungsstrategien mit *L. monocytogenes* als Carrier zu untersuchen.

6.8 *L. monocytogenes* als DNA-Carrier

Aus den oben genannten Gründen wurden erste Experimente zur Einbringung eukaryontischer Antigenexpressionsvektoren in DZ mit Hilfe von *L. monocytogenes* durchgeführt. Um *Listerien* für die Übertragung eukaryontischer Antigenexpressionsvektoren zu nutzen, konstruierten Dietrich und Kollegen (1998) einen Vektor, der zusätzlich zu den für DNA Vakzine essentiellen eukaryontischen Promotor mit dem dazugehörenden antigenkodierenden Gen, ein Phagenlysin trägt. Das Phagenlysin ist hinter einem *actA*-Promotor angeordnet. Dieser Vektor, p3LGFP118, ermöglicht die direkte Einbringung eukaryontischer Antigenexpressionsvektoren in das Zytosol der APZ. Die Plamid-tragenden *Listerien* dringen in die APZ ein. Nach dem Befreien aus dem Phagosom lysieren sich die Bakterien im Zytosol der infizierten Zelle selbst. Die Autolyse führt zur Freisetzung der Plasmid-DNA, was schließlich die Wirtszelle zur Expression plasmidkodierter Antigene und zur Präsentation dieser Antigene zusammen mit MHC Klasse I befähigt. Das Plasmid ist für die intrazelluläre Lyse der Bakterien verantwortlich; zusätzlich trägt es das antigenkodierende Gen unter der Kontrolle des in Eukaryontenzellen stark aktiven Promotors P_{CMV} (*major intermediate early promotor/enhancer* vom humanen Zytomegalievirus). Die Lyse der *Listerien* in infizierten Zellen wird durch die Expression des Phagenlysins PLY118 des *Listeria*-spezifischen Bakteriophagen A118 unter Kontrolle des *actA*-Promotors ausgelöst. Da P_{actA} erst nach der Befreiung der Bakterien aus dem Phagosom aktiviert wird (Dietrich *et al.*, 1998, 1999), erfolgt die Expression des Phagenlysins und die daraus resultierende bakterielle Lyse erst im Zytosol der Wirtszelle. Die PLY118-vermittelte Autolyse der *Listerien* im Zytosol der Wirtszelle führt zur Freisetzung intakter Plasmid-DNA. Die Anzahl an Zellen, bei denen ein erfolgreicher Plasmidtransfer stattfand, konnte anhand der Expression des plasmidkodierten GFP ermittelt werden (Gentshev *et al.*, 2000). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der Fluoreszenzmikroskopie wurde gezeigt, dass bis zu 1% der *L. monocytogenes* p3LGFP118-infizierten DZ ein Signal zeigten. Dass dabei die Fluoreszenz in den GFP-exprimierenden DZ über die gesamte Zelle verteilt war, beweist die Produktion von GFP durch die Wirtszelle. Der relativ geringe Anteil leuchtender DZ im Vergleich

zur hohen Infektionsrate könnte daran liegen, dass nur wenige der aufgenommenen *Listerien* sich aus dem Phagosom befreien können. Die Mehrheit der Bakterien, inklusive der Plasmid-DNA kann bereits im Phagosomen der DZ zersetzt werden. Die Infektion DZ mit *L. monocytogenes* p3LGFP118 führte wie beim Wildtyp zur Reifung der infizierten Zelle. CD25, CD83, CD86 und MHC Klasse II wurden stark hochreguliert. DZ-Reifung geht mit einer verstärkten Kapazität der Antigenpräsentation einher.

Damit konnte klar gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* ein vielversprechender Vektor von eukaryontischen Antigenen ist und zur Entwicklung neuer Vakzinierungsstrategien herangezogen werden kann.

6.9 Ausblicke

L. monocytogenes kann als möglicher Carrier für die DNA-Vakzinierung humane DZ aktivieren. Die reife DZ besitzt eine ausgeprägte Fähigkeit, naive T-Zellen zu stimulieren. Vieles deutet darauf hin, dass eine T-Zell vermittelte Immunantwort sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht bereits während der Antigenpräsentation bestimmt wird. Der jeweilige Funktionszustand der Antigenpräsentierenden Zelle (APZ) und die von der APZ ausgeschütteten Zytokine bestimmen Art und Ausmaß der T-Zellaktivierung (Kim *et al.*, 1998; Osaki., 1999). Aus diesem Grund ist es von Interesse zu untersuchen, welche Zytokine während der Infektion mit *L. monocytogenes* freigesetzt werden. Immunstimulierende Zytokine beeinflussen den Erfolg einer Vakzinierung. Der direkte Zytokinnachweis kann mittels ELISA aus dem Zellkulturüberstand infizierter DZ durchgeführt werden. Folgende inflammatorische Zytokine sind dabei von besonderem Interesse: IL-12 und IL-18. IL-12 ist der wichtigste Faktor zur Unterstützung einer T-Helfer 1 (Th-1) Immunantwort (Wolf *et al.*, 1994). Die Rolle von IL-12 bei der Entwicklung einer Th-1 Antwort unterstreicht die Bedeutung des Zytokins im Hinblick auf die Regulation einer Immunantwort. IL-18 besitzt eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung verschiedener Erkrankungen wie Tumoren und Infektionen (Sugwara, 2000). Sowohl IL-12 als auch IL-18 besitzen antitumorale Effekte und könnten somit den Erfolg einer Vakzinierung günstig beeinflussen.

Nach Aufnahme von *L. monocytogenes* in unreife dendritische Zellen kommt es zur Ausreifung der DZ. Im allgemeinen werden reife DZ nach Antigenpräsentation

apoptotisch. Aus diesem Grund sollte in der Zukunft untersucht werden, ob myeloide Vorläuferzellen der DZ mit Hilfe von *L. monocytogenes* als DNA-Carrier transfiziert werden können. Es ist denkbar, dass durch die Transfektion von Stammzellen ein längerlebigeres Kompartiment für die Expression des eukaryontischen Antigenexpressionsvektors entsteht. Neben der ruhenden CD34-positiven Stammzelle, sollten Stammzellen untersucht werden, die mit unterschiedlichen Differenzierungsmedien behandelt werden. Dadurch können sich ruhende Stammzellen in Richtung der Makrophagen oder in Richtung der DZ entwickeln.

7 Literatur

Aiba S. 1998. Maturation of dendritic cells induced by cytokines and haptens. *Tohoku J. Exp. Med.* 184:159-172.

Alvarez-Dominguez C., E. Carrasco-Marin, F. Leyva-Cobian. 1993. Role of complement C1q in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophages-like cell lines. *Infect. Immun.* **61**:3664-3672.

Arnoldi J., H. Moll. 1998. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Dev. Immunol.* **6**:3-11.

Banchereau J., R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245–252.

Baorto D.M., Z. Gao, R. Malaviya, M.L. Dustin, A. van der Merwe, D.M. Lublin, S.N. Abraham. 1997. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* **389**:636-639.

Barsig J., S. Kaufmann. 1997. The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. *Infect. Immun.* **65**:4075-4081.

Bellomo G., M. Perotti, F. Taddei, F. Mirabelli, G. Finardi, P. Nicotera, S. Orrenius. 1992. Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intracellular free Ca²⁺ concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res.* **52**:1342-1346.

Bender A., M. Sapp, G. Schuler, R. M. Steinman, N. Bhardwaj. 1996. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Meth.* **196**:121–135.

Biroum-Noerjasin. 1977. Listericidal activity of non-stimulated and stimulated human macrophages in vitro. Clin. Exp. Immunol. **28**:138-145.

Bohne J., Z. Sokolovic, W. Goebel. 1994. Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. **11**:1141-1150.

Braun L., H. Ohayon, P. Cossart. 1998. The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. Mol. Microbiol. **27**:1077–1087.

Bubert A., S. Köhler, W. Goebel. 1992. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria spp.* by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2625-2632.

Bubert A., Kestler H., M. Götz, R. Bockmann, W. Goebel. 1997. *The Listeria monocytogenes iap* gene as an indicator gene for the study of PrfA-dependent regulation. Mol. Gen. Genet. **256**:54-62.

Bubert A., Z. Sokolovic, S. Chun, L. Papatheodorou, A. Simm, W. Goebel. 1999. Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. Mol. Gen. Genetics **261**: 323-336.

Caux C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, M. Azuma, K. Okumura, L.L. Lanier, J. Banchereau. 1994. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J. Exp. Med. **180**:1841-1847.

Cella M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, G. Alber. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhance T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. J. Exp. Med. **184**:747-752.

Cleveland M.G., J.D. Gorham, T.L. Murphy, E. Tuomanen, K.M. Murphy. 1996. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. Infect. Immun. **64**:1906-1912.

Corinti S., D. Medaglini, A. Cavani, M. Rescigno, G. Pozzi, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Girolomoni. 1999. Human dendritic cells very efficiently present a heterologous antigen expressed on the surface of recombinant gram-positive bacteria to CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **163**:3029-3036.

Cossart P., M. Lecuit. 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signalling. *EMBO journal* **17**:3797-3806.

Courvalin P., S. Goussard, C. Grillot-Courvalin. 1995. Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *CR Acad. Sci. III* **318**:1207-1212.

Darji A., C.A. Guzman, B. Gerstel, P. Wachholz, K.N. Timmis, J. Wehland, T. Chakraborty, S. Weiss. 1997. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* **91**:765-775.

Decatur A.L., D.A. Portnoy. 2000. A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science* **290**:992-995.

Dietrich G., A. Bubert, I. Gentschev, Z. Sokolovic, A. Simm, A. Katic, S. H. E. Kaufmann, J. Hess, A. A. Szalay, W. Goebel. 1998. Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat. Biotechnol.* **16**:181–185.

Dietrich G., I. Gentschev, J. Hess, J.B. Ulmer, S.H.E. Kaufmann, W. Goebel. 1999. Delivery of DNA vaccines by attenuated intracellular bacteria. *Immunol. Today* **20**:251-253.

Domann E., W. Leimeister-Wächter, W. Goebel, T. Chakraborty. 1991. Molecular cloning , sequencing and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect. Immun.* **59**:65-72.

Donnelly J.J., J.B. Ulmer, J.W. Shiver, M.A. Liu. 1997. DNA Vaccine. *Ann. Rev. Immunol.* **15**:617-648.

Dramsi S., I. Biswas, E. Maguin, L. Braun, P. Mastroeni, P. Cossart. 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* **16**:251–261.

Dramsi S., P. Dehoux, M. Lebrun, P.L. Goosens, P. Cossart. 1997. Identification of four members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect. Immun.* **65**:1615-1625.

Drevets D.A., P.A. Campbell. 1991. Roles of complement and complement receptor type 3 in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by inflammatory mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **59**:2645-2652.

Drevets D.A., R.T. Sawyer, T.A. Potter, P.A. Campbell. 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun.* **63**:4268–4276.

Engelbrecht F., S.-K. Chun, C. Ochs, J. Hess, F. Lottspeich, W. Goebel, Z. Sokolovic. 1996. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol. Microbiol.* **21**:823–837.

Esche C., A. Lokshin, G.V. Shurin, B.R. Gastmann, H. Rabinowich, S.C. Watkins, M.T. Lotze, M.R. Shurin. 1999. Tumor's other immune targets: dendritic cells. *J. Leuko. Biol.* **66**:336-344.

Fanger N.A., K. Wardwell, L. Shen, T.F. Tedder, P.M. Guyre. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cell. *J. Immunol.* **15**:541-548.

Fanger N.A., L.C. d. Voigtlaender, S. Swink, K. Wardwell, J. Fisher, R.F. Graziano, L.C. Pfefferkorn, P.M. Guyre. 1997. Characterization of expression,

cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor FcγRI (CD64) expressed on human blood dendritic cell. *J. Immunol.* **158**:3090-3098.

Farber J. M., P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**:476-511.

Fesus L., P.J.A. Davies, M. Piacentini. 1991. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur. J. Cell Biol.* **56**:170-177.

Fiedler F. 1988. Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general view. *Infection* **16**:92-97.

Filgueira L., F.O. Nestle, M. Rittig, H. I. Joller, P. Groscurth. 1996. Human dendritic cells phagocytose and process *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* **157**:2998-3005.

Flo T.H., O. Halaas, E. Lien, L. Rayan, G. Teti, D.T. Golenbock, A. Sudan, T. Espevik. 2000. Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **164**:2064-2069.

Gaillard J.L., P. Berche, C. Frehel, E. Guin, P. Cossart. 1991. Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**:1127–1141.

Gentschev I., G. Dietrich, S. Spreng, A. Kolb-Mäurer, J. Daniels, J. Hess, S.H. Kaufmann, W. Goebel. 2000. Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J. Biotechnol.* **83**:19-26.

Geginat G., M. Lalic, M. Kretschmar, W. Goebel, H. Hof, D. Palm, A. Bubert. 1998. Th1 cell specific for a secreted protein of *Listeria monocytogenes* are protective *in vivo*. *J. Immunol.* **160**:6046-6055.

Geginat G., T. Nichterlein, M. Kretschmar, S. Schenk, H. Hof, M. Lalic-Mülthaler, W. Goebel, A. Bubert. 1999. Enhancement of the *Listeria monocytogenes* p60-specific CD4 and CD8 T cell memory by nonpathogenic *Listeria innocua*. *J. Immunol.* **162**:4781-4789.

Geoffroy C., J.L. Gaillard, J.E. Alouf, P. Berche. 1987. Purification, characterization and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **55**:1641-1646.

Goebel W., J. Kreft. 1997. Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends Mikrobiol.* **5**:86-88.

Granucci F., E. Ferrero, M. Foti, D. Aggujaro, K. Vettoretto, P Ricciardi-Castagnoli. 1999. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes Infect.* **1**:1079-1084.

Gray M.L., A.H. Killinger. 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* **30**:309-382.

Green D.R., J.C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**:1309-1312.

Greiffenberg L., Z. Skolovic, H.-J. Schnittler, A. Spory, R. Böckmann, W. Goebel, M. Kuhn. 1997. *Listeria monocytogenes*-infected human umbilical vein endothelial cells: internalin-independent invasion, intracellular growth, movement, and host cell responses. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**:163–170.

Greiffenberg L., W. Goebel, K. S. Kim, I. Weiglein, A. Bubert, F. Engelbrecht, M. Stins, M. Kuhn. 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InIB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect. Immun.* **66**:5260–5267.

Grillot-Courvalin C., S. Goussard, P. Courvalin. 1999. Bacteria as gene delivery vectors for mammalian cells. *Curr. Opi. in Biotech.* **10**:477-481.

Guzman C. A., M. Rohde, T. Chakraborty, E. Domann, M. Hudel, J. Wehland, K. N. Timmis. 1995. Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* **63**:3665-3673.

Guzman C. A., E. Domann, M. Rohde, D. Bruder, A. Darji, S. Weiss, J. Wehland, T. Chakraborty, K.N. Timmis. 1996. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **20**:119-126.

Harrington-Fowler L., P.M. Henson, M. S. Wilder. 1981. Fate of *Listeria monocytogenes* in resident and activated macrophages. *Infect. Immun.* **33**:11-16.

Harty J.T., E.G. Pamer. 1995. CD8 T lymphocytes specific for the secreted p60 antigen protect against *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **154**:4642-4650.

Hassett D.E., J.L. Whitton. 1996. DNA immunization. *Trends Microbiol.* **4**:307-312.

Hauf N., W. Goebel, F. Fiedler, Z. Skolovic, M. Kuhn. 1997. *Listeria monocytogenes* infection of P388D₁ macrophages results in a biphasic NF- κ B (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by I κ B α and I κ B β degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:9394–9399.

Henderson R. A., S. C. Watkins, J. L. Flynn. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **159**:635-643.

Hof H., T. Nichterlein, A. Ulbricht, G. Stehle. 1993. Die Listeriose der Erwachsenen – eine Lebensmittelinfektion? *Dt. Ärztebl.* **90**: 229-232.

Hohlfeld R., A.G. Engel. 1994. The immunobiology of muscle. *Immunol. Today.* **15**:269-273.

Inaba K., M. Inaba, M. Naito, R.M. Steinman. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including Bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens *in vivo*. *J. Exp. Med.* **178**:479-488.

Inaba K., M. Witmer-Pack, M. Inaba, K.S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P.S. Linsley, S. Ikehara. 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells *in situ* and during maturation *in vivo*. *J.Exp. Med.* **180**:1849-1860.

Ingulli E., A. Mondino, A. Khoruts, M.K. Jenkins. 1997. *In vivo* detection of dendritic cell antigen presentation to CD4⁺T cells. *J. Exp. Med.* **185**:2133-2141.

Jakob T., P. S. Walker, A. M. Krieg, M. C. Udey, J. C. Vogel. 1998. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immunol.* **161**:3042-3049.

Jensen E.R., H. Shen, F.O. Wettstein, R. Ahmed, J.F. Miller. 1997 Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle and a probe for studying cell-mediated immunity. *Immunol Rev.* **158**:147-157.

Jones S., D.A. Portnoy. 1994. Characterization of *Listeria monocytogenes* pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O. *Infect. Immun.* **62**:5608-5613.

Kalinski P., J.H. Schuitemaker, C.M. Hilkens, E.A. Wierenga, M.L. Kapsenberg. 1999. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cell. *J. Immunol.* **162**:3231-3236.

Kampelmacher E.H., L.M. van Noorle Jansen. 1972. Further studies on the isolation of *Listeria monocytogenes* in clinically healthy individuals. *Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. Orig.* **221**:70-77.

Kaplan G. 1977. Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors in macrophages. *Scand. J. Immunol.* **6**:797-807.

Kaufmann S.H.E. 1993. Immunity against intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:129-163.

Keller R., W. Fischer, R. Keist, S. Bassetti. 1992. Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect. Immun.* **60**:3664-3672.

Kelsall B.L., W. Strober. 1996. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J. Exp. Med.* **183**:237-247.

Kerr J.F.R., A.H. Wyllie, A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**:239-257.

Kim J.J., N.N. Trivedi, L.K. Nottingham, L. Morrison, A. Tsai, Y. Hu, S. Mahalingam, K. Dang, L. Ahn, N. K. Doyle, D.M. Wilson, M.A. Chattergoon, A.A. Chalian, J.D. Boyer, M.G. Agadjanyan, D.B. Weiner. 1998. Modulation of amplitude and direction of *in vivo* immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. *Eur. J. Immunol.* **28**:1089-1103.

Kobe B., J. Deisendorf. 1994. The leucin-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* **19**:415-421.

Kolb-Mäurer A., I. Gentschev, H.W. Fries, F. Fiedler, E.B. Bröcker, E. Kämpgen, W. Goebel. 2000. *Listeria monocytogenes*-infected human dendritic cells: uptake and host cell response. *Infect. Immun.* **68**:3680-3688.

Kopp E.B., R. Medzhitov. 1999. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **11**:13-18.

Krammer P.H. 2000. Apoptose. *Deutsches Ärzteblatt* **97**:1481-1488.

Kuhn M., S. Kathariou, W. Goebel. 1988. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **62**:348-356.

Kuhn M., W. Goebel. 1989. Identification of an extracellular protein of *L. monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect. Immun.* **57**:55-61.

Kuhn M., W. Goebel. 1995. Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Genet. Eng.* **17**:31-51.

Larsson M., M. Majeed, J.D. Ernst, K.E. Magnusson, O. Stendahl, U. Forsum. 1997. Role of annexins in endocytosis of antigens in immature human dendritic cells. *Immunology* **92**:501-511.

Leimeister-Wächter M., E. Domann, C. Haffner, W. Goebel, T. Chakraborty. 1990. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:8336-8340.

Libby S.J., W. Goebel, A. Ludwig, N. Buchmeier, F. Bowe, F.C. Fang, D.G. Guiney, J.G. Songer, F. Heffron. 1994. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:489-493.

Ludewig B., B. Odermatt, A.F. Ochsenbein, R.M. Zinkernagel, H. Hengartner. 1999. Role of dendritic cells in the induction and maintenance of autoimmune diseases. *Immunol Rev.* **169**:45-54.

Martin S.J., D.R. Green, T.G. Cotter. 1994. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* **19**:26-30.

McLellan A.D., E. Kämpgen. 2000. Functions of myeloid and lymphoid dendritic cells. *Immunol. Lett.* **72**:101-105.

Mellman I., S. J. Turley, R. M. Steinman. 1998. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trend Cell Biol.* **8**:231–237.

Mengaud J., H. Ohayon, P. Gounon, R.-M. Mege, P. Cossart. 1996. E-cadherin is a receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**:923–932.

Mitchell D.A., S.K. Nair, E. Gilboa. 1998. Dendritic cell/macrophage precursors capture exogenous antigen for MHC class I presentation by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **28**:1923-1933.

Mordue D.G., L.D. Sibley. 1997. Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J. Immunol.* **159**:4452-4459.

Nestle F.O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, D. Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* **4**:328-332.

Nicoletti I., G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* **139**:271-279.

O'Doherty U., M. Peng, S. Gezelter, W.J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj, R.M. Steinman. 1994. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature, and the other immature. *Immunology* **82**:487-493.

Ojcius D.M., Y. Bravo de Alba, J.M. Kanellopoulos, R.A. Hawkins, K.A. Kelly, R.G. Rank, A. Dautry-Varsat. 1998. Internalization of *Chlamydia* by dendritic cells and stimulation of *Chlamydia*-specific T cells. *J. Immunol.* **160**:1297-1303.

Osaki T., Hashimoto W., Gambotto A., Okamura H., Robbins P.D., Kurimoto M., Lotze M.T., Tahara H. 1999. Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18). *Gene Ther.* **6**:808-815.

Paglia P., C. Chiodoni, M. Rodolfo, M.P. Colombo. 1996. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime CTL against tumor antigen in vivo. *J. Exp. Med.* **183**:317-322.

Paglia P., E. Medina, I. Arioli, C.A. Guzman, M.P. Colombo. 1998. Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. **92**:3172-3176.

Paglia P., C.A. Guzman. 1998. Keeping the immune system alerted against cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **46**:88-92.

Pan Z.-K., G. Ikonomodis, A. Lazenby, D. Pardoll, Y. Paterson. 1995. A recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine expressing a model tumor antigen protects mice against a lethal tumour challenge and causes regression of established tumors. *Nature Med.* **1**:471-477.

Peck R. 1985. A one-plate assay for makrophage bactericidal activity. *J. Immunol. Meth.* **82**:131-140.

Portnoy D.A., T. Chakraborty, W. Goebel, P. Cossart. 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* **60**:1263-1267.

Racz P., K. Tenner, E. Mero. 1972. Experimental *Listeria* enteritis. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. *Lab. Invest.* **26**:694-700.

Raghupathy R. 1997. Th I-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. today* **18**:478-482.

Raffelsbauer D., A. Bubert, F. Engelbrecht, J. Scheinpflug, A. Simm, J. Hess, S.H. Kaufmann, W. Goebel. 1998. The gene cluster inIC2DE of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol. Gene Genet.* **260**:144–158.

Regnault A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, S. Amigorena. 1999. Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalisation. *J. Exp. Med.* **189**:371-380.

Reis e Sousa C., A. Sher, P. Kaye. 1999. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Cur. op. Immunol.* **11**:392-399.

Rescigno M., Granucci F., Citterio S., Foti M., P. Ricciardi-Castagnoli. 1999. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol. today.* **20**:200-203.

Rieser C., R. Ramoner, G. Böck, Y.M. Deo, L. Hörtl, G. Bartsch, M. Thurnher. 1998. Human monocyte-derived dendritic cells produce macrophage colony-stimulating factor: enhancement of c-fms expression by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* **28**:2283-2288.

Riva S., M.L. Nolli, M.B. Lutz, S. Citterio, G. Girolomoni, C. Winzler, P. Ricciardi-Castagnoli. 1996. Bacteria and bacterial cell wall constituents induce the production of regulatory cytokines in dendritic cell clones. *J. Inflamm.* **46**:98-105.

Rock K.L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, A.L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* **78**:761-771.

Rodriguez A., A. Regnault, M. Kleijmeer, P. Ricciardi-Castagnoli, S. Amigorena. 1999. Selective transport of internalized antigens to cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nature Cell Biol.* **1**:362-368.

Romani N., D Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kämpgen, B. Eibl, D. Niederwieser, G. Schuler. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. *An*

improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* **196**:137-151.

Rowan N.J., A.A.G. Candlish, A. Bubert, J.G. Anderson, K. Kramer, J. McLauchlin. 2000. Virulent rough filaments of *Listeria monocytogenes* from clinical and food samples secreting wild-type levels of cell-free p60 protein. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2643-2648.

Sallusto F., A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factors plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factors α . *J. Exp. Med.* **179**:1109-1118.

Sallusto F., A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**:389-400.

Schoppet M., H.I. Huppertz, A. Simm, A. Bubert. 2000. Infection of dendritic cells by enterobacteriaceae. *Med. Microbiol. Immunol.* **188**:191-196.

Schuler R., Steinman R.M. 1997. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J. Exp. Med.* **186**:1183-1187.

Schwandner R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, C.J. Kirschning. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* **274**:17406-17409.

Seeliger H.P.R. 1984. Modern taxonomy of the *Listeria* group-relationship to its pathogenicity. *Clin. Invest. Med.* **7**:217-221.

Shen H., M.K. Slifka, M. Matloubian, E.R. Jensen, R. Ahmed, J.F. Miller. 1995. Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle for the induction of protective anti-viral cell-mediated immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:3987-3991.

Shen Y., M. Naujokas, M. Park, K. Ireton. 2000. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**:501-510.

Sieling P.A., D. Jullien, M. Dahlem, T.F. Tedder, T.H. Rea, R.L. Modlin, S.A. Porcelli. 1999. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J. Immunol.* **162**:1851-1858.

Sizemore D.R., A.A. Branstrom, J.C. Sadoff. 1995. Attenuated *Shigella* as DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* **270**:299-302.

Sparwasser T., E.-S. Koch, R.M. Vabulas, K. Heeg, G.B. Lipfort, J.W. Ellwart, H. Wagner. 1998. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cell. *Eur. J. Immunol.* **28**:2045-2054.

Steinman R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:271-296.

Steinman R.M., K. Inaba. 1999. Myeloid dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **66**:205-208.
Sugwara I. 2000. Interleukin-18 (IL-18) and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes Infect.* **2**:1257-1263.

Svenson M., B. Stockinger, M. Wick. 1997. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T-cells *J. Immunol.* **158**:4229-4236.

Takashima A., A. Morita. 1999. Dendritic cells in genetic immunization. *J. Leukoc. Biol.* **66**:350-356.

Tan M. C.A.A., A.M. Mommaas, J.W. Drijfhout, R. Jordens, J.J.M. Onderwater, D. Verwoerd, A.A. Mulder, A.N. van der Heiden, D. Scheidegger, L.C.J.M. Oomen, T.H.M. Ottenhoff, A. Tulp, J.J. Neefjes, F. Koning. 1997. Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhance HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *J. Immunol.* **27**:2426-2435.

Thompson C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.

Thornberry N.A., Y. Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science* **281**:1312-1316.

Thurner B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E.B. Bröcker, R.M. Steiman, A. Enk, E. Kämpgen, G. Schuler. 1999. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* **190**:1669-1678.

Tilney L.G., D.A. Portnoy. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **109**:1597-1608.

Townsend A., J. Trowsdale. 1993. The transporters associated with antigen presentation. *Semin. Cell Biol.* **4**:53-61.

Uchikawa K., J. Sekikawa, I. Azuma. 1986. Structural studies on lipoteichoic acids from four *Listeria* strains. *J. Bact.* **168**:115-122.

Vandenabeele S., L. Wu. 1999. Dendritic cell origins: puzzles and paradoxes. *Immunol. cell biol.* **77**:411-419.

Verhasselt V., C. Buelens, F. Willems, D. De Groote, N. Haeffner-Cavaillon, M. Goldman. 1997. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J. Immunol.* **158**:2919-2925.

Watts C. 1999. Dendritic cells spill the beans. *Nature Cell Biol.* **6**:152-154.

Wertz I.E., M.R. Hanley. 1996. Diverse molecular provocation of programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* **21**:359-364.

Wicken A.J., K.W. Knox. 1977. Biological properties of lipoteichoic acids. In: Schleisinger, D. (ed.): *Microbiology-1977*. American Society for Microbiology, Washington. 360-365.

Wicken A.J.. 1980. Structure and cell membrane-binding properties of bacterial lipoteichoic acids and their possible role in adhesion of *streptococci* to eukaryotic cells. In: Beachey E.H. (ed): *Bacterial adherence*, Chapman and Hall Ltd. 137-158.

Wilder M.S., J.C. Edberg. 1973. Interaction of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* with cultured mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **7**:409-415.

Winzler C., P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V. S. Zimmermann, J. Davoust, P. Ricciardi-Castagnoli. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* **185**:317-328.

Wolf S.F., D. Sieburth, J. Sypek 1994. Interleukin-12: a key modulator of immune function. *Stem Cells Dayt.* **12**:154-168.

Wuenscher M.D., S. Köhler, A. Bubert, U. Gerike, W. Goebel. 1993. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J. Bacteriol.* **175**:3491-3501.

Zitvogel L, J.I. Mayordomo, T. Tjandrawan, A.B. DeLeo, M.R. Clarke, M.T. Lotze, W.J. Storkus. 1996. Therapy of murine tumors with tumor peptide pulsed dendritic cells: Dependence on T-cells, B7 costimulation, and Th-1-associated cytokines. *J. Exp. Med.* **183**:87-97.

Zhou L.J., T.F. Tedder. 1995. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood.* **86**:3295-3301.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

A	Amper
Abb.	Abbildung
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BHI	Brain-Heart-Infusion
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumionen
CD	Cluster Differentiation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSSK	Fettsäureseitenketten
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Hly	Listeriolysin O
HP	Humanplasma
HS	Humanserum
IgG	γ-Immunglobuline
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
<i>L. m.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LRR	Leuzin-reiche-Region
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure

M	Molar
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
MLR	gemischte Leukozytenreaktion
Mo-DZ	aus Monozyten hergestellte dendritische Zellen
MOI	Multiplizität der Infektion
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
p.a.	zur Analyse
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PI	Propidium Iodid
p.i.	post infection
rh	rekombinant human
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.o.	siehe oben
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Th	T-Helfer Zellen
TLR	<i>toll</i> ähnliche Rezeptoren
TNF	Tumor Nekrose Faktor
u.a.	unter anderem
U	Einheiten
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
w/v	„weight to volume“
V	Volt
v/v	„volume to volume“

8.2 Summary

Dendritic cells (DC) activate naive CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes and are therefore critical for the initiation of an immune response against microorganisms.

In this work the interaction between DC and *L. monocytogenes* was examined. Immature DC show a very efficient uptake of *L. monocytogenes*. Phagocytosis was much higher in the presence of human plasma than with plasma free media or media with fetal calf serum (FCS). However, the addition of immunoglobulins showed a concentration dependent increase in phagocytosis comparable with the addition of human plasma. Human plasma contains antibodies against the listerial surface protein p60. By using a *iap*-deletion mutant it was shown that antibodies against p60 are the main opsonin for the uptake of *L. monocytogenes* into DC. Because no difference in the uptake of this deletion mutant in the presence or absence of human plasma was observed; antibodies against p60 appear to be responsible for the efficient uptake of *L. monocytogenes* and other apathogenic *Listeria* strains.

A major portion of internalized bacteria is found in membrane-bound phagosomes and rarely free in the cytosol. Most of the bacteria that were taken up by DC were killed very efficiently in the phagosome. Interestingly, infection with *L. monocytogenes* caused maturation of the immature DC into mature DC. This effect appeared to be largely mediated by listerial lipoteichoic acid. Although *L. monocytogenes* infection is known to induce death in other cell types, DC were relatively resistant and only 20% of infected DC underwent cell death.

Uptake, maturation and resistance to apoptosis suggest that DC are essential antigen presenting cell (APC) for *L. monocytogenes* immunity.

Thus these observations into the interaction of *L. monocytogenes* with human DC provide an important insight into the pathogenesis of *Listeria* infection as well as providing a basis for *Listeria*-based vaccination strategies.

8.3 Curriculum Vitae

Name: Dr. med. Annette Kolb-Mäurer, geb. Kolb

Geb. Datum: 22.05.1968, Darmstadt

Adresse: Am Trog 8
97076 Würzburg

Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Mathias Mäurer, Arzt

Kinder: Jonas Mathias Mäurer, geb. 01.12.1993

Hannah Miriam Mäurer, geb. 13.11.1995

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schule:

1978 - 1987 Gymnasium Viktoriaschule, Darmstadt

23.05.1987 Abitur

wissenschaftlicher und beruflicher Werdegang:

1987 – 1990 Medizinstudium, Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg

1990 – 1991 Medizinstudium an der Université de Caen

1991 - 1994 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Julius-Maximilian Universität in Würzburg

05 – 07/93 Studienaufenthalt am St. Vincent Hospital/Indiana Heart Institute, Indianapolis, USA

18.10.1994 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

1994 - 1995 Promotionsstipendium (HSP III)

10.07. 1996 Promotion (magna cum laude) zum Dr. med.

(Nachweis der RNA des Myelinproteins P0 im peripheren Nerven mit Hilfe nicht-radioaktiver Hybridisierungstechnik; Doktorvater Prof. Hartung, Neurologische Universitätsklinik Würzburg)

1996 Wiedereinstiegsstipendium (HSP III) Labor Dr. E. Kämpgen, Hautklinik Universität Würzburg

1997 – 1998 Ärztin im Praktikum (ÄiP), Hautklinik Universität Würzburg,
Direktorin: Prof. Dr. E.-B. Bröcker

01.04.1998 Approbation als Ärztin

seit 04/98 MD/PhD Stipendiatin, IZKF Universität Würzburg

04.09.1998 Zulassungsprüfung zum Promotionsstudiengang Biologie

08/98 – 12/00 Doktorandin im Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität
Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. W. Goebel
(Interaktion humaner dendritischer Zellen mit *Listeria monocytogenes*)

Würzburg, den 08.01.2001

8.4 Publikationsliste

8.4.1 Originalarbeiten

Kolb-Mäurer A., Gentschev I., Fries H.-W., Fiedler F., Bröcker E.-B., Kämpgen E., Goebel W. *Listeria monocytogenes*-infected human dendritic cells: uptake and host-cell response. *Infect Immun* 2000. **68**:3680-3688.

Neumann M., Fries H-W., Scheicher C., Keikavoussi P., **Kolb-Mäurer A.**, Bröcker E.-B., Serfling E., Kämpgen E. Differential expression of Rel/NF-kB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood* 2000. **95**: 277-285.

Gentschev I., Dietrich G., Spreng S., **Kolb-Mäurer A.**, Daniels J., Hess J., Kaufmann S.H.E., and Goebel W. Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J. Biotechnology*. 2000. **83**:19-26.

Kolb-Mäurer A., Pilgrim S., Kämpgen E., Bröcker E.-B., Goebel W., Gentschev I. Antibodies against listerial protein p60 act as an opsonin for the phagocytosis of *L. monocytogenes* by human dendritic cells. *Infect. Immun.* revised manuscript submitted.

Dietrich G.*, **Kolb-Mäurer A.***, Spreng S., Scharl M., Goebel W., Gentschev I. Gram-positive and Gram-negative bacteria as carrier systems for DNA Vaccines. *Vaccine*. in press.

*beide Autoren leisteten gleichen Beitrag

Gentschev I., Dietrich G., Spreng S., **Kolb-Mäurer A.**, Brinkmann V., Grode L., Hess J., Kaufmann S.H.E., Goebel W. Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines. *Vaccine*. in press.

8.4.2 Abstracts

Kolb-Mäurer A., Gentschev I., Fries H.-W., Fiedler F., Goebel W., Bröcker E.-B., Kämpgen E. Infection of human dendritic cells with *Listeria monocytogenes* induces maturation via lipoteichoic acid. Arch. Dermatol. Res. 2000; **292**: 107.

Kolb-Mäurer A., Gentschev I., Kämpgen E., Goebel W. Infection of human dendritic cells with *L. monocytogenes*. Biospektrum 2000; p.112.

Kolb-Mäurer A., Gentschev I., Goebel W.. Aspects of pathogenicity of *Listeria monocytogenes*. J. neurology. 2000. **247**:195.

Kolb-Mäurer A., Pilgrim S., Kämpgen E., Bröcker E.-B., Goebel W., Gentschev I. Antibodies against listerial protein p60 trigger the uptake of *Listeria monocytogenes* into human dendritic cells. Immunobiology. 2000. **203**:324.

Fries H.-W., Neumann M., Keikavoussi P., **Kolb-Mäurer A.**, Bröcker E.-B., Kämpgen E. Generation of dendritic cells from human monocytes and their cytokine driven maturation involve distinct patterns of Jak/Stat protein expression. Archives of dermatological research 1999. **291**:160.

Fries H.-W., Neumann M., Keikavoussi P., **Kolb-Mäurer A.**, Bröcker E.-B., Kämpgen E. Human monocytes activate different expression patterns of proteins of the Jak/Stat pathway during differentiation into dendritic cells or macrophage Immunobiology 1998. **199**:584.