

---

Entwicklung neuartiger bakterieller Vektoren zur Übertragung  
von zellassozierten Antigenen, DNA und RNA auf der Basis  
virulenzattenuierter *L. monocytogenes*

---

DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Christoph Schoen**

aus Gunzenhausen

Würzburg 2005

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: .....

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Goebel

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Frosch

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## **Erklärung**

Der experimentelle Teil dieser Doktorarbeit wurde von Januar 2001 bis Juli 2004 am Lehrstuhl für Mikrobiologie im Biozentrum 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 an dieser Arbeit folgende Personen beteiligt:

Dr. Dr. A. Kolb-Mäurer (Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Würzburg), PD Dr. G. Geginat (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Fakultät für klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg), Dr. B. Bergmann (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Biozentrum der Universität Würzburg), Dr. S. Pilgrim (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Biozentrum der Universität Würzburg) und D. Löffler (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Biozentrum der Universität Würzburg).

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 .....

## Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Goebel für die Vergabe des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Darüber hinaus hat er mir mit seiner wissenschaftlichen Unterstützung stets geholfen und dadurch einen wesentlichen Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit geleistet.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. M. Frosch, der sich spontan bereit erklärt hat, sich als Zweitgutachter dieser Arbeit zur Verfügung zu stellen.

Neben der Hilfe vieler anderer Lehrstuhlmitarbeiter möchte ich mich außerdem bei Dr. J. Stritzker für viele konstruktive Diskussionen bedanken sowie bei Dr. J. Slaghuis für die Hilfe im Umgang mit den Fluoreszenzmikroskopen und bei Dr. S. Pilgrim für die Einarbeitung in Labor C216.

Bei Monika Goetz möchte ich mich für die Hilfe bei der Mikroinjektion und der teilweisen Durchführung einer Reihe von Injektionsexperimenten bedanken.

Roy danke ich ganz herzlich dafür, dass er mir die Arbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie ermöglicht hat und damit sehr viel mehr als nur den Erwerb des „Dr. rer. nat.“!

Den Mitgliedern der *International Academy of Beerologists* (IAB) danke ich für die Erkenntnis, dass auch in wissenschaftlich schwierigen Phasen einer Promotionsarbeit Hopfen und Malz nicht verloren gehen müssen.

Besonders Enno und Hannes danke ich sehr für die abwechslungsreiche und fröhliche Zeit abseits von Pipetten und Petrischalen.

Von ganzem Herzen danke ich Gaby für ihre liebevolle Geduld und - wenn nötig - moralische Unterstützung, die mich insbesondere über die schwierigen Phasen dieser Promotionsarbeit hinweggetragen haben.

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern für die persönliche und nicht zuletzt auch finanzielle Unterstützung bedanken, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	1
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	3
2.1	Die anhaltende Bedrohung durch Infektionskrankheiten	3
2.2	Die historischen Erfolge der Vakzinierung	3
2.3	Eine effektive Antigenpräsentation ist Voraussetzung für die Erzeugung einer protektiven Immunität	4
2.4	Anforderungen an einen idealen Impfstoff	5
2.5	Die klassischen Strategien der Impfstofferzeugung	6
2.6	Das Versagen der klassischen Impfstoffe	7
2.7	Neue Weg der Impfstoffentwicklung	7
2.7.1	Nukleinsäurevakzine	7
2.7.2	Rekombinante Lebendimpfstoffe	8
2.8	Vorteile rekombinanter Bakterien als Träger heterologer Impfstoffe	8
2.9	<i>Listeria monocytogenes</i>	9
2.9.1	Allgemeine Mikrobiologie und Pathogenese	9
2.9.2	Infektionszyklus und Virulenzfaktoren	10
2.9.3	Interaktion von <i>L. monocytogenes</i> mit antigenpräsentierenden Zellen und Induktion einer Immunantwort	12
2.10	<i>L. monocytogenes</i> als Impfstoffträger	14
2.10.1	Expression heterologer Antigene in <i>L. monocytogenes</i> am Beispiel von HIV	15
2.10.2	Bakterielle Übertragung von DNA-Vakzinen mit Hilfe von <i>L. monocytogenes</i>	17
2.11	Experimenteller Ansatz	19
2.12	Zielsetzung dieser Arbeit	20
<b>3.</b>	<b>Material</b>	21
3.1	Geräte	21
3.2	Verbrauchsmaterialien	22
3.3	Chemikalien	22
3.4	Stammlösungen der verwendeten Puffer	22
3.5	Oligonukleotide	23
3.6	Plasmide	25
3.7	Bakteriologische Nährmedien	28
3.8	Antibiotikazusätze	28
3.9	Sonstige Medienzusätze	29
3.10	Bakterienstämme	29
3.11	Lösungen und Medien für die Zellkultur	31
3.12	Zelllinien	31
3.13	Spezialchemikalien für zellbiologische Versuche	31
3.14	Antikörper für Elektronenmikroskopie (EM), Fluoreszenzmikroskopie (FM) und	

Immunoblots (IB)	32
3.15    Verwendete Software	32
<b>4.    Methoden</b>	<b>33</b>
4.1    Molekularbiologische Arbeiten mit DNA	33
4.1.1  Isolierung chromosomaler DNA aus <i>L. monocytogenes</i>	33
4.1.2  Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im Mini-Maßstab (Miniprep)	33
4.1.3  Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im Midi-Maßstab (Midiprep)	33
4.1.4  Schnelllysate von Bakterienkolonien für PCR	33
4.1.5  Restriktionsverdau von Plasmid- und genomischer DNA	34
4.1.6  Polymerasekettenreaktion	34
4.1.7  Rekombinante PCR	35
4.1.8  Quantifizierung von DNA mittels <i>Real-Time</i> -PCR	36
4.1.9  Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen	36
4.1.10  Elektrophoretische Trennung von DNA in nativen Agarosegelen	36
4.1.11  Elektrophoretische Trennung von DNA in nativen Polyacrylamidgelen	37
4.1.12  Extraktion von DNA aus Agarosegelen	37
4.1.13  Extraktion von DNA aus Polyacrylamidgelen	38
4.1.14  Phosphorylierung von DNA-Enden	38
4.1.15  Dephosphorylierung von DNA-Enden mittels alkalischer Phosphatase	38
4.1.16  Glätten von einzelsträngigen DNA-Enden	38
4.1.17  Hybridisierung von einzelsträngigen Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA	39
4.1.18  Ligation von DNA-Fragmenten	39
4.1.19  Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> DH10b	39
4.1.20  Elektroporation von <i>E. coli</i> DH10b	40
4.1.21  Sequenzierung von DNA	40
4.2    Arbeiten mit RNA	41
4.2.1  Extraktion von Gesamt-RNA aus Bakterienzellen	41
4.2.2  Slot-Blot	41
4.2.3  Hybridisierung und Detektion membrangebundener Nukleinsäuren mit Hilfe des „AlkPhos Direct Labelling Kit“ und „CDP-Star“	41
4.3    Proteinanalytische Verfahren	42
4.3.1  Fraktionierte Extraktion von Proteinen aus <i>L. monocytogenes</i> für SDS-PAGE	42
4.3.2  Photometrische Quantifizierung von Proteinen	42
4.3.3  Elektrophorese von Proteinen in Polyacrylamidgelen nach Laemmli (SDS-PAGE)	42
4.3.4  Western-Blot	43
4.4    Bakteriologische Arbeiten mit <i>L. monocytogenes</i>	45
4.4.1  Herstellung kompetenter <i>L. monocytogenes</i> für die Elektroporation	45
4.4.2  Elektroporation kompetenter <i>L. monocytogenes</i>	45
4.4.3  Wechsel von stabilisierten Plasmiden in <i>L. monocytogenes</i> $\Delta trpS$ („Ausschütteln“)	45
4.4.4  Herstellung von Infektionsaliquots von <i>L. monocytogenes</i> für Zellkulturversuche	46

4.4.5	Immunfluoreszenzfärbung von Bakterien auf Deckgläschen	46
4.4.6	Immunogoldfärbung von Oberflächenproteinen auf <i>L. monocytogenes</i>	47
4.4.7	Messung der GFP-Expression in Bakterienzellen mittels Durchflusszytometrie	47
4.5	Zellbiologische Arbeiten	48
4.5.1	Lagerung von Zelllinien	48
4.5.2	Kultivierung permanenter Zelllinien	48
4.5.3	Passagieren permanenter Zelllinien	48
4.5.4	Präparation von primären murinen DC aus Knochenmark	48
4.5.5	Gewinnung von humanen monozytären DC aus peripherem Blut	49
4.5.6	Vitalzellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung	49
4.5.7	Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT-Test	49
4.5.8	Durchflusszytometrische Vitalitätsbestimmung mittels 7-Aminoactinomycin D	50
4.5.9	Zellzyklusmessung mittels Flusszytometrie propidiumiodidgefärbter Zellen	50
4.5.10	Mikroinjektion von Plasmid-DNA in das Zytoplasma adhärenter Zellen	50
4.5.11	Intrazytoplasmatische Mikroinjektion von Bakterien	51
4.5.12	Transfektion adhärenter Zellen mit Lipofectamine™ Plus™	51
4.5.13	Infektion von adhärenten Zellen	51
4.5.14	Invasions-Test	52
4.5.15	Infektion von primären murinen BMDC	52
4.5.16	Infektion von hmoDC	52
4.5.17	Durchflusszytometrie fluoreszierender Säugerzellen	52
4.5.18	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von adhärenten Zellen auf Deckgläschen für die Fluoreszenzmikroskopie	53
4.5.19	<i>In vitro</i> -Antigenpräsentation	53
4.6	Konstruktion von Plasmiden zur Expression von Reportergenen mit Hilfe von <i>L. monocytogenes</i>	54
4.6.1	Konstruktion der Plasmide pSP118-eEGFP und pCAG-EGFP	54
4.6.2	Konstruktion von Plasmiden zur bakteriellen Übertragung von mRNA in Säugerzellen	55
4.6.2.1	Konstruktion der pCSA-Plasmide	55
4.6.2.2	Konstruktion der pCSB-Plasmide	56
4.6.3	Konstruktion von Plasmiden zur Expression zellwandverankerter Proteine in <i>L. monocytogenes</i>	59
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	62
5.1	Verankerung von heterologen Proteinen in der Zellwand von <i>L. monocytogenes</i>	62
5.1.1	Heterologe Verankerung von ActA in der Zellwand von <i>L. monocytogenes</i>	63
5.1.2	Verankerung von GFP	64
5.1.3	Verankerung von Ovalbumin in der Zellwand von <i>L. monocytogenes</i>	65
5.1.4	Einfluss der Verankerung auf die Vitalität und Virulenz der Trägerstämme	66
5.1.5	Zusammenfassung	67
5.2	Untersuchungen zur bakteriellen Übertragung eukaryontischer Expressionsplasmide	

	auf Säugerzellen mittels <i>L. monocytogenes</i>	67
5.2.1	Bestimmung von Stabilität und Kopienzahl der Plasmide pFLO1, pMK4 und pUNK1	68
5.2.2	Baktinfektion von dendritischen Zellen	68
5.2.3	Abschätzung der Effizienz der bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA in verschiedenen Zelltypen	70
5.2.4	Mikroinjektion von Bakterien und Plasmid in das Zytoplasma von Caco-2-Zellen	72
5.2.5	Einfluss der Mitose auf die Baktinfektionsraten	74
5.2.6	Einfluss von Interferon- $\gamma$ auf die Reporterexpression	75
5.2.7	Zusammenfassung	76
5.3	Übertragung von mRNA auf Säugerzellen mittels <i>L. monocytogenes</i>	78
5.3.1	Konstruktion eines T7-Expressionssystems in <i>L. monocytogenes</i> $\Delta trpS$	78
5.3.2	Charakterisierung der Stämme zur Übertragung von RNA	79
5.3.3	Übertragung von EGFP-codierender mRNA in Caco-2-Epithelzellen	82
5.3.4	Analyse des Übertragungsprozesses in Caco-2-Zellen mittels Infektion mit Kontrollstämmen	84
5.3.5	Einfluss spezifischer Inhibitoren von Transkription und Translation auf die Expression von EGFP in Caco-2-Zellen	85
5.3.6	Analyse der Transformationseffizienz in verschiedenen Zelltypen	86
5.3.7	Übertragung von mRNA auf antigenpräsentierende Zellen	87
5.3.8	Zytotoxizität der RNA-Trägerstämme <i>in vitro</i>	89
5.3.9	Einfluss eines 3'-Poly-A-Traktes auf die frühe EGFP-Expression in phagozytischen Zellen	90
5.3.10	Einfluss des T7-Expressionssystems auf die Fitness der Trägerbakterien	90
5.3.11	Zusammenfassung	91
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	93
6.1	Verankerung heterologer Proteine in der Zellwand von <i>L. monocytogenes</i>	93
6.2	Baktinfektion von Säugerzellen mittels <i>L. monocytogenes</i>	95
6.3	Die Baktinfektion von APC mit <i>L. monocytogenes</i> ist ineffizient und langsam	99
6.4	Bakterielle Übertragung von mRNA auf Säugerzellen mittels <i>L. monocytogenes</i>	100
6.5	Ausblick	106
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	108
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	136
8.1	Abkürzungsverzeichnis	129
8.2	Lebenslauf	131
8.3	Publikationsliste	132

## 1. Zusammenfassung

*Listeria monocytogenes* ist ein fakultativ humanpathogenes Bakterium und aufgrund seiner Fähigkeit, in Zellen des Wirtes einzudringen und sich im Zytoplasma der befallenen Wirtszelle zu vermehren, ein attraktiver Träger, um heterolog exprimierte Antigene in den MHC-I- und -II-Präsentationsweg antigenpräsentierender Zellen (APC) einzuschleusen und so eine effektive zelluläre Immunreaktion zu erzeugen.

Dabei hat die Art und Weise der Antigenexpression einen wesentlichen Einfluss auf die Erzeugung der antigenspezifischen Immunität. So konnte unter Verwendung extrazellulärer Trägerbakterien gezeigt werden, dass insbesondere die Verankerung von Antigenen auf der Zelloberfläche der Bakterien zu einer effektiven Induktion einer humoralen Immunantwort führt. Mit dem Ziel, mit einem derartigen Ansatz auch eine zelluläre Immunität zu erzeugen, wurde ein Plasmidsystem für die Expression von heterologen Proteinen in der Zellwand von *L. monocytogenes* entwickelt. Dabei gelang die Verankerung zahlreicher Proteine eukaryontischer wie auch prokaryontischer Herkunft über das LPXTG-Ankermotiv von Internalin A. Die so erzielte starke Expression in der Zellwand setzte aber sowohl die Fitness der Bakterien als auch deren Invasivität *in vitro* deutlich herab und verhinderte damit eine effektive MHC-I-Präsentation des verwendeten Modellantigens.

Alternativ wurde *L. monocytogenes* bereits erfolgreich zur Übertragung von DNA-Vakzinen eingesetzt, um so auch die Synthese gegebenenfalls posttranslational modifizierter Antigene in ihrer korrekten Konformation durch die infizierte Wirtszelle zu erzielen. Allerdings erfolgte die Expression des als Reporterprotein verwendeten EGFP insbesondere in APC sehr langsam und war von geringer Effizienz. Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass nach bakterieller Übertragung von DNA-Vakzinen der Import der Plasmidmoleküle in den Kern insbesondere sich nicht teilender Zellen einen der wichtigsten Engpässe für eine möglichst frühzeitige und effektive Reporterexpression darstellt.

Einen Ausweg bietet die bakterielle Übertragung codierender mRNA, die unmittelbar nach der Freisetzung aus der Bakterienzelle im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle zur Translation zur Verfügung steht. Dazu wurde das 5'-Ende der EGFP-codierenden Sequenz mit dem IRES-Element des Encephalomyocarditisvirus genetisch fusioniert. Um eine möglichst hohe Syntheserate zu erzielen und damit dem Abbau der mRNA in der Bakterienzelle entgegenzuwirken, erfolgte die Synthese der mRNA in *L. monocytogenes* mit Hilfe eines T7-RNA-Polymerase-basierten Transkriptionssystems. Im Gegensatz zur bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA konnte so bereits 4 h nach Infektion sowohl in epithelialen als auch in APC wie Makrophagen und humanen dendritischen Zellen eine deutliche EGFP-Expression nachgewiesen werden sowie bei Verwendung von Ovalbumin als Reporterprotein eine effektive MHC-I-Präsentation *in vitro*. Damit stellt die bakterielle Übertragung von mRNA einen vielversprechenden neuartigen Ansatz dar zur Erzeugung einer zellulären und gegebenenfalls auch humoralen Immunantwort gegen posttranslational modifizierte Antigene.

## Summary

*Listeria monocytogenes* is a facultative intracellular bacterium that enters the cell by phagocytosis after which it colonizes the cytosol of the host cell. It is thus a potent vaccine vector for the presentation of passenger antigens to the major histocompatibility complex class II and class I pathways.

The mode of antigen expression has a major impact on the generation of a specific immune response. Compared to the expression of antigens in a secreted form or localized inside the bacterial cell, the display of heterologous antigens on the surface of bacteria has shown to be a potent strategy for the elicitation of efficient immune responses. Therefore, a plasmid system for the expression of heterologous proteins covalently linked to the cell wall of *L. monocytogenes* via the LPXTG cell wall anchor of Internalin A was developed. Although efficient expression of a number of proteins could be achieved by this approach the resulting high expression levels in turn reduced the invasiveness and overall fitness of the carrier *Listeria* and thus impaired the delivery efficiency of the encoded antigen to the antigen processing machinery of the infected host cell.

As an alternative approach to the delivery of protein antigens synthesized by the prokaryotic cell *Listeria* might also be exploited for the delivery of DNA vaccines enabling the correct expression also of posttranslationally modified passenger antigens by the eukaryotic cell. However, it is demonstrated that the uptake of the plasmid DNA into the nucleus is a major limiting step for achieving early and efficient gene expression in non-dividing and therefore also in antigen presenting cells. Comparable to other non-viral transfection techniques like lipofection, the limited access to the nuclear compartment may thus constitute a major barrier also after bacteria-mediated expression plasmid DNA delivery.

To overcome this bottleneck, a self-destructing *L. monocytogenes* strain was employed for the release of translation-competent mRNA directly into the cytosol of epithelial cells, macrophages and human dendritic cells. EGFP-encoding mRNA, adapted for translation in mammalian cells by linking an IRES element to the 5'-end of the *egfp* coding sequence, was produced by T7 RNA polymerase in the carrier bacteria upon entry into the cytosol where the mRNA is efficiently released from the lysed bacteria and immediately translated in eukaryotic host cells. Besides the much earlier expression of EGFP being detectable already 4 h after infection, the number of EGFP expressing mammalian cells obtained with this novel RNA delivery technique is comparable to or - especially in phagocytic cells - even higher than that obtained with the expression plasmid DNA delivery strategy. Accordingly, bacteria-mediated delivery of ovalbumin-encoding mRNA to macrophages resulted in efficient antigen processing and presentation *in vitro*.

In conclusion, this approach might also be adapted for the *in vivo* delivery of antigen-encoding mRNA leading to a more efficient immune response also against posttranslationally modified antigens such as viral envelope proteins and thus might lead to the development of novel vaccines.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die anhaltende Bedrohung durch Infektionskrankheiten

Nach wie vor stellen Infektionskrankheiten eine große Herausforderung für die globalen Gesundheitssysteme dar. So waren im Jahr 2002 28 Millionen Menschen weltweit mit HIV infiziert wovon 3 Millionen an AIDS verstarben. Insgesamt sind bis dato 22 Millionen Menschen AIDS zum Opfer gefallen [361]. Die durch *Plasmodium falciparum* verursachte *Malaria tropica* schlägt mit 300 bis 500 Millionen Neuinfektionen jedes Jahr besonders in den tropischen Breiten zu Buche und fordert dort zwischen 1 und 3 Millionen Todesfälle vor allem unter Kleinkindern und Säuglingen [285]. Unter den bakteriellen Infektionserkrankungen erlebt die Tuberkulose im Zuge der HIV-Pandemie eine Renaissance: Derzeit ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit *Mycobacterium tuberculosis* infiziert, davon 50000 zusätzlich mit HIV. Jedes Jahr sind 8 Millionen Neuinfektionen zu registrieren sowie 2 Millionen Todesfälle [79]. Und infolge inadäquater medikamentöser Therapie sind mittlerweile mehr als 50 Mio. Menschen weltweit mit multiresistenten *M. tuberculosis*-Stämmen infiziert [163]. Daneben sind auch 15,6% aller Krebstodesfälle weltweit als Langzeitfolge von Infektionen mit kanzerogenen Erregern wie z. B. Hepatitis B-Viren (HBV), *Helicobacter pylori* oder humanen Papillomaviren (HPV) anzusehen [88]. Damit sind Infektionskrankheiten in der Altersgruppe der 15 bis 59 Jährigen weltweit die häufigste Todesursache [361]. Schließlich gesellen sich in jüngster Zeit neue Gefahren hinzu wie z. B. im Zuge des Bioterrorismus die bewusste Ausbringung von „alten“, eventuell auch gentechnisch veränderten Infektionserregern wie *Bacillus anthracis* im Jahr 2001 und die unkontrollierte Verbreitung „neuer“ Keime im Zuge des weltweiten Tourismus wie die des SARS-Coronavirus im Jahr 2002/03 [361].

Zwar wurden auf der Seite der Therapie von Infektionskrankheiten in den letzten Jahren zum Teil bedeutende Fortschritte erzielt. Heute stehen sowohl gegen Malaria als auch gegen Tuberkulose und HIV wirksame Therapien zur Verfügung. Doch aufgrund der Gefahr einer Resistenzentwicklung sind diese meist kostspielige Mehrfachtherapien, die über einen längeren Zeitraum eingenommen werden müssen und mit teilweise erheblichen Nebenwirkungen belastet sind [121]. Daher ist die Compliance der Patienten sehr unterschiedlich mit dem Ergebnis, dass aufgrund einer dann unzureichenden Therapie wie im Falle der Tuberkulose resistente Keime selektiert werden. Und im Falle der HIV-Therapie ist selbst eine über Jahre eingenommene Kombinationstherapie (HAART) nicht in der Lage, der Resistenzentwicklung sicher vorzubeugen und das Virus aus dem Blut zu eliminieren [46]. Die kosteneffektivste und wirksamste Maßnahme zur Lösung dieser Probleme wäre daher die primäre Prävention durch aktive Immunisierung.

### 2.2 Die historischen Erfolge der Vakzinierung

Der Begriff Vakzine leitet sich vom lateinischen Wort für Kuh (*vacca*, -*ae*) ab und bezeichnet den ursprünglich aus Kuhpockenlymphe hergestellten Impfstoff gegen Pocken. Heute wird der Begriff Vakzine synonym für Impfstoff verwendet. Nachdem erstmals Edward Jenner (1749-1823) im Jahr 1798 nachwies, dass eine Impfung mit Kuhpocken Schutz gegen die Pockenkrankheit des Menschen gewährt, wurden in den darauffolgenden 100 Jahren aufgrund der Erkenntnisse der damals

aufblühenden Mikrobiologie erstmals Impfstoffe unter anderem gegen Milzbrand (1881) und Tollwut (1885) durch Louis Pasteur (1822-1895), oder gegen *Typhus abdominalis* (1886) und Cholera (1896) durch Wilhelm Kolle (1868-1935) entwickelt.

Dank bedeutender Fortschritte in der Impfstoffentwicklung sowie infolge weltweit durchgeführter Impfprogramme kam es besonders in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts zu einem starken Rückgang von Krankheiten wie Tetanus, Diphtherie, Keuchhusten und Kinderlähmung und im Jahr 1979 sogar zur Ausrottung der Pocken [359]. In den 90er Jahren wurde auf dem amerikanischen Kontinent schließlich nur noch ein einziger Fall von Kinderlähmung (Poliomyelitis) bekannt, so dass 1994 die Vereinigten Staaten für poliofrei erklärt werden konnten [48]. Weltweit waren im Jahr 2003 schließlich nur noch in sieben Ländern Polioviren endemisch, so dass trotz Rückschlägen in jüngster Zeit auch die weltweite Eradikation von Polioviren in erreichbarer Nähe scheint [360].

### **2.3 Eine effektive Antigenpräsentation ist Voraussetzung für die Erzeugung einer protektiven Immunität**

Die aktive Immunisierung beruht auf der Erzeugung von spezifischen, gegen Erregerantigene gerichteter T- und B-Gedächtniszellen [2]. Dazu müssen die Erregerantigene zuerst in einer Art und Weise durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden [21], die zu einer Aktivierung von entsprechend spezifischen B- und vor allem T-Zellen führt [158].

Zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort sind neben Makrophagen ( $M\Phi$ ) vor allem dendritische Zellen (DC) von zentraler Bedeutung [276]. Sie stellen das Bindeglied zwischen angeborener, unspezifischer Immunität und erworbener, spezifischer Immunantwort dar und siedeln als spezialisierte Wächterzellen des Immunsystems in nahezu allen Organen, insbesondere an Orten vermehrter Antigenexposition wie der Haut und den Schleimhäuten [13]. Dringen Mikroorganismen oder Fremdkörper ins Gewebe ein, werden die Antigene von unreifen DC aufgenommen. Dies führt zur Aktivierung der DC mit Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), wodurch weitere Immunzellen rekrutiert werden. Die aktivierten DC wandern nun über die Lymphbahnen zu den Lymphknoten. Während dieser Migration prozessieren DC die phagozytierten Antigene und differenzieren sich zu reifen DC, die in den Lymphknoten eine Lebensdauer von ca. zwei bis drei Tagen haben [180]. Die ausgereifte DC besitzt eine ausgeprägte Fähigkeit, Antigene zu präsentieren und naive T-Zellen zu stimulieren [124]. Antigene extrazellulärer Bakterien sowie von intrazellulären Mikroorganismen, die im Phagosom persistieren wie zum Beispiel Mykobakterien, werden von phagosomalen Proteasen prozessiert und bevorzugt zusammen mit Haupthistokompatibilitätsklasse-II (MHC-II)-Molekülen CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen ( $T_H$ ) präsentiert [228]. Im Unterschied dazu werden zytosolische Antigene, die z. B. von Viren oder zytosolischen Bakterien stammen, von Proteasomen abgebaut und die entstandenen Peptide anschließend ins endoplasmatische Retikulum (ER) eingeschleust und dort an MHC-I-Moleküle gebunden [278]. Über den Golgi-Apparat gelangen sie auf die Zelloberfläche und können im Komplex mit MHC-I-Molekülen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert werden, die daraufhin zu zytotoxischen T-Zellen (CTL) differenzieren.

Zusätzlich besitzen DC einen effizienten Mechanismus, um phagosomal verdaute Antigene ins Zytosol zu translozieren und somit auch phagosomale Fremdproteine in den sogenannten alternativen MHC-I-Präsentationsweg einzuschleusen [3,279]. Das ist von entscheidender Bedeutung, da eine protektive Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene idealerweise sowohl T<sub>H</sub>-Zellen als auch CTL einbeziehen sollte [161].

Die nach Präsentation aktivierten, antigenspezifischen T-Zellen setzen die Immunantwort fort, indem sie T<sub>H</sub>-Zellen Zytokine freisetzen und mit anderen Zellen wie B-Zellen und MΦ interagieren oder als CTL infizierte Zellen lysieren. Das während der Antigenpräsentation vorhandene Zytokinmilieu bestimmt dabei die Richtung, in die sich naive T<sub>H</sub>-Zellen entwickeln. Durch Wechselwirkungen von molekularen Strukturen der Erreger (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) mit spezifischen Oberflächenrezeptoren der DC (*pathogen recognition receptors*, PRR), zu deren prominentesten Mitgliedern die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) gehören, wird in den DC eine Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt, die schließlich in der Expression verschiedener Zytokine wie z. B. IL-12 oder IL-18 sowie der gesteigerten Expression von Oberflächenproteinen wie z. B. CD-40L oder CD80 mündet [341]. Auf diese Art und Weise wird die Art des Infektionserregers umcodiert in ein spezifisches Muster sezernierter Zytokine bzw. kostimulatorischer Oberflächenmoleküle, die dann zu einer Polarisierung der T<sub>H</sub>-Zellantwort in eine Typ-1 (T<sub>H</sub>1)- und eine Typ-2 (T<sub>H</sub>2)-Antwort führt [154]. In Gegenwart von IL-12 differenzieren sich die T-Helferzellen in T<sub>H</sub>1-Zellen, in Abwesenheit von IL-12 und in Gegenwart kostimulatorischer Moleküle wie z. B. CD80 oder CD86 auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden DC in T<sub>H</sub>2-Zellen. T<sub>H</sub>1-Zellen unterstützen die Bildung von opsonisierenden Antikörpern (Ak) sowie die zelluläre Immunantwort durch die Bildung von IL-2, Interferon-γ (IFN-γ) und CD40-CD40L-Interaktion. Die dabei aktivierten CTL können einerseits direkt infizierte Zellen zerstören. Andererseits können die gleichfalls produzierten Antikörper über eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) ebenfalls die Lyse infizierter Zellen durch z. B. *Natural-Killer* (NK)-Zellen vermitteln [161]. Durch Opsonisierung der Erreger können sie außerdem deren Phagozytose durch MΦ verbessern, wobei das aus CTL und T<sub>H</sub>1-Zellen freigesetzte INF-γ zu einer Aktivierung von MΦ und in Folge dessen zu einer effizienteren Abtötung phagozytierter Erreger führt [161]. Durch die Sezernierung von IL-4, IL-5 und IL-10 unterstützen T<sub>H</sub>2-Zellen die humorale Immunantwort, da diese Cytokine die Reifung von B-Lymphozyten auslösen. Die dabei synthetisierten Ak können z. B. durch die Bindung an Oberflächenantigene der Erreger deren Aufnahme in ihre Wirtszellen unterbinden sowie durch Komplexbildung bakterielle Toxine neutralisieren [235]. Über den klassischen Weg der Komplementaktivierung können sie zusätzlich zu einer komplementabhängigen Lyse der Erreger führen. Das von T<sub>H</sub>2-Zellen gebildete IL-5 stimuliert insbesondere die IgA-Synthese und ist daher für die mukosale Immunabwehr entscheidend.

#### **2.4 Anforderungen an einen idealen Impfstoff**

Aufgrund dieser zentralen Stellung der DC in der Induktion einer adaptiven Immunität sollte ein idealer Impfstoff zu einer möglichst effizienten Antigenpräsentation durch DC und zu einer Aktivierung entsprechender T-Zellen führen. Er sollte eine möglichst protektive und langanhaltende, gegen intrazelluläre Keime vorwiegend zelluläre und gegen extrazelluläre Keime vor allem humorale

Immunantwort erzeugen [228]. Da die Schleimhäute häufig die wichtigsten primären Eintrittspforten für Infektionserreger wie z. B. *M. tuberculosis* oder HIV darstellen [60] und damit der mukosalen Immunität eine zentrale Rolle bei der Immunität gegen solche Erreger zugesprochen wird [221], sollte er ferner oral applizierbar sein und dadurch zur Induktion einer effektiven mukosalen Immunität führen. Daneben besitzen Schluckimpfungen im allgemeinen eine höhere Akzeptanz in der Bevölkerung und sind kostengünstiger durchzuführen als parenterale Impfungen [343]. Weiterhin sind günstige Produktionskosten und die Möglichkeit einer Lagerung bei höheren Temperaturen gerade für den Einsatz in Entwicklungsländern wichtige Kriterien [189]. Nicht zuletzt sollte der Impfstoff natürlich risikofrei sein und keine unerwünschten Nebenwirkungen verursachen, insbesondere nicht bei Kleinkindern [41].

## **2.5 Die klassischen Strategien der Impfstoffherzeugung**

Die meisten der heute verwendeten Impfstoffe können grob in die Gruppe der Tot- und in die der Lebendimpfstoffe eingeteilt werden [83].

Totimpfstoffe können zum einen aus ganzen, abgetöteten Erregern bestehen wie z. B. die heute zur Impfung gegen Kinderlähmung eingesetzte Salk-Vakzine (IPV), die aus formalin-inaktivierten Polioviren besteht [257]. Andererseits werden auch aufgereinigte Erregerbestandteile bzw. rekombinant hergestellte Erregerantigene in Form von sogenannten Spaltvakzinen verwendet. Beispiele hierfür sind die Toxoidimpfstoffe gegen Tetanus [353] und Diphtherie [231], der rekombinant in Hefezellen hergestellte Impfstoff gegen Hepatitis-B-Viren [209] oder der Konjugatimpfstoff gegen *Haemophilus influenzae* B [351]. Gegenüber den abgetöteten Ganzkeimvakzinen haben Spaltvakzine den Vorteil, dass sie in ihrer aufgereinigten Form keine anderen, reaktogenen Nebenbestandteile enthalten und damit weniger Nebenwirkungen auslösen. Gemeinsam ist beiden Formen von Totimpfstoffen, dass sie eine vorwiegend humorale Immunantwort auslösen und parenteral verabreicht werden müssen.

Demgegenüber können Lebendimpfstoffe auch eine zelluläre Immunantwort auslösen sowie je nach Impfstoff oral verabreicht werden und stellen so eigentlich die Idealform eines Impfstoffes dar. Sie bestehen aus attenuierten, d. h. in ihrer Virulenz abgeschwächten, aber nach wie vor immunogenen Erregern. Prominenteste Beispiele sind die heute als Tripelvakzine verabreichten Impfstoffe gegen Masern [275], Mumps [258] und Röteln [256] sowie der Polioimpfstoff nach Sabin (OPV) [325], welche aus in Zellkultur passagierten Viren bestehen. Am Beispiel des Sabin-Impfstoffes wird aber auch eine potentielle Gefahr von Lebendimpfstoffen, nämlich die der Reversion der attenuierten Erreger in den virulenten Wildtyp, deutlich. So führte die mit OPV weltweit durchgeführte Impfkampagne gegen Poliomyelitis dazu, dass die Wahrscheinlichkeit, nach Impfung mit OPV an Poliomyelitis zu erkranken, höher war als die Wahrscheinlichkeit, sich über den normalen Infektionsweg mit Polioviren zu infizieren. Deshalb wurde der OPV-Impfstoff 1998 in Deutschland durch den inaktivierten Impfstoff ersetzt [316].

## 2.6 Das Versagen der klassischen Impfstoffe

Trotz der Erfolge mit diesen klassischen Vakzinen stellen gerade die drei weltweit wichtigsten Infektionskrankheiten Malaria, Tuberkulose und AIDS die Impfstoffentwicklung weiterhin vor besondere Herausforderungen [192]. Eine für die Erzeugung eines effektiven Impfschutzes wesentliche Gemeinsamkeit der drei Erkrankungen besteht darin, dass alle drei durch intrazelluläre Erreger verursacht werden, zu deren Abwehr neben neutralisierenden Antikörpern vor allem die zelluläre Immunität von zentraler Bedeutung ist [95,107,354]. Ein wirksamer Impfstoff müsste außerdem zu einer Erzeugung antigenspezifischer  $T_H1$ -Zellen und CTL sowie neutralisierender IgA-Antikörpern an den Schleimhäuten führen. Dazu sind herkömmliche Totimpfstoffe nicht in der Lage. Andererseits wäre die Herstellung eines Lebendimpfstoffes z. B. gegen HIV mit den herkömmlichen Methoden der Attenuation aufgrund der hohen Mutationsrate der HI-Viren und der damit verbundenen Gefahr einer Reversion attenuierter Viren zum Wildtyp nicht vertretbar [349]. Allein gegen *M. tuberculosis* gibt es derzeit einen lizenzierten Impfstoff auf der Basis des attenuierten *Mycobacterium bovis*-Impfstammes BCG, dessen Effektivität allerdings in verschiedenen Studien sehr stark variierte und der keinen zuverlässigen Schutz vor einer Lungentuberkulose vermittelt, welche die häufigste Verlaufsform einer Infektion mit *M. tuberculosis* bei Erwachsenen darstellt [307]. Und aufgrund des komplexen Entwicklungszyklusses sowie der damit verbundenen stadienspezifischen Expression verschiedener Antigene war die Entwicklung sowohl von Lebendvakzinen als auch von Totimpfstoffen gegen *P. falciparum* bisher nur von bescheidenem Erfolg gekrönt, da die Immunität durch attenuierte Lebendvakzine nur stadienspezifisch war und die große Anzahl verschiedener Antigene die Auswahl eines möglichst gegen alle Stadien protektiven Antigens sehr erschwert [354].

## 2.7 Neue Weg der Impfstoffentwicklung

Zu den neuen Strategien der Impfstoffentwicklung können in erster Linie die Nukleinsäurevakzine [191] sowie die rekombinanten Lebendimpfstoffe gerechnet werden. Obwohl beide Verfahren bisher vorwiegend in Tierversuchen untersucht wurden, gibt es aber auch schon erste ermutigende klinische Studien [5,217,219,229,233].

### 2.7.1 Nukleinsäurevakzine

Bei der Impfung mit nackter DNA werden eukaryontische Expressionsplasmide verwendet, bei denen ein heterologes Antigen unter der Kontrolle eines starken eukaryontischen Promotors steht. Je nach Applikationsweg resultiert eine Immunisierung von Versuchstieren in einer z. T. auch protektiven Immunität sowohl gegen virale wie auch bakterielle und Tumorantigene [125]. Diese umfasst sowohl die Bildung spezifischer Antikörper als auch die von  $T_H$ -Zellen und CTL [298]. Entsprechende Ergebnisse konnten auch in Tierversuchen bei parenteraler Impfung mit antigencodierender mRNA erzielt werden [143,150,214]. Zwar besitzen DNA-Vakzine gegenüber RNA-Vakzinen den Vorteil einer größeren chemischen Stabilität gegen Abbau durch ubiquitäre Nukleasen und führen aufgrund einer Depotwirkung zu einer länger anhaltenden Antigensynthese durch die transformierte Zelle. Allerdings hat die Immunisierung mit RNA gegenüber der mit Plasmid-DNA den großen Vorteil, dass es hier nicht zu einer Integration der Nukleinsäure in das Genom der eukaryontischen Zelle kommt, so wie es bei der Immunisierung mit Plasmid-DNA beschrieben wurde [350]. Die Integration der Plasmid-DNA

kann zur Folge haben, dass es durch die auf dem Plasmid codierten eukaryontischen Promotoren zu einer Aktivierung von zellulärer Protoonkogenen kommt und damit zu malignem Wachstum [128]. Gemeinsam ist beiden Varianten, dass es großer Mengen hochaufgereinigter DNA bzw. RNA sowie spezieller Adjuvantien bedarf, wodurch die Herstellung dieser Impfstoffe recht kosten- und arbeitsintensiv wird [90]. Außerdem resultiert die parenterale Applikation von DNA-Vakzinen in keiner mukosalen Immunität, und eine orale Applikation nackter Nukleinsäuren ist bisher nicht möglich [106].

### **2.7.2 Rekombinante Lebendimpfstoffe**

Als ein weiterer neuer Weg der Impfstoffherstellung ist die Erzeugung und Verwendung rekombinanter bakterieller und viraler Lebendimpfstoffe zu nennen. Rekombinante bakterielle wie auch virale Trägersysteme haben gegenüber der Immunisierung z. B. mit aufgereinigten Nukleinsäuren oder Proteinantigenen den Vorteil, dass sie automatisch von den für die Erzeugung einer Immunantwort wichtigen APC aufgenommen werden. Ähnlich wie die klassischen attenuierten Lebendvakzine imitieren sie eine natürliche Infektion und interagieren dabei mit den humoralen, zellulären und insbesondere auch den mukosalen Kompartimenten des Immunsystems. Aufgrund ihrer immunstimulatorischen Moleküle wirken sie so automatisch auch als Adjuvans. Dies erlaubte z. B. die Verbesserung des zur Impfung gegen Tuberkulose eingesetzten *M. bovis* BCG-Impfstammes [141,146] sowie die Herstellung von neuartigen, als Lebendimpfstoff einsetzbaren virulenzattenuierten *M. tuberculosis*-Wildtypbakterien [287]. Zum anderen werden rekombinante attenuierte Viren [261] und Bakterien [167] seit einigen Jahren auch sehr erfolgreich für die Expression heterologer Antigene getestet. Im Vergleich zu Totimpfstoffen können sie das heterologe Antigen über längere Zeit synthetisieren und damit zu einer verlängerten Exposition des Antigens führen [171]. So hat man rekombinante *Modified Vaccinia Virus Ankara* (rMVA) verwendet, um Antigene aus *M. tuberculosis* [219], *P. falciparum* [217,229] und HIV [5,233] heterolog zu exprimieren und die resultierenden rMVA-Stämme in sogenannten Prime-Boost-Strategien eingesetzt. Hierbei erfolgten ein oder mehrere Erstimpfungen (*priming*) mit einem DNA-Impfstoff, der für ein bestimmtes Erregerantigen oder mehrere verschiedene Erregerepitope codierte und einige Zeit später eine zweite Impfung (*boost*) mit den rMVA-Stämmen. Besonders beeindruckend waren dabei die Ergebnisse einer derartigen DNA-Prime-rMVA-Boost-Strategie bei der Suche nach neuen Malariaimpfstoffen. In zwei Phase-I-Studien konnte eine effektive, gegen das Präerythrozyten-Malariaantigen TRAP gerichtete T-Zellantwort erzielt werden, die sowohl CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-Zellen umfasste und teilweise einen Schutz gegenüber einer Infektion mit *P. falciparum* vermittelte [217,229]. Zwar konnte in diesen Studien auch die gesundheitliche Unbedenklichkeit der verwendeten rMVA bei gesunden Probanden belegt werden. Doch birgt die Verwendung von rMVA bei der Impfung von Personen, die unter einer unerkannten Immunschwäche oder Stoffwechselerkrankung wie z. B. Diabetes mellitus leiden, z. T. große gesundheitliche Risiken [138].

### **2.8 Vorteile rekombinanter Bakterien als Träger heterologer Impfstoffe**

Gegenüber viralen rekombinanten Trägern besitzen rekombinante Bakterien eine Reihe praktischer wie auch prinzipieller Vorteile [171]:

1. So benötigen sie zu ihrer Vermehrung keine aufwendigen Zellkulturmethoden und können in einfachen Nährmedien angezüchtet und damit auch in großer Menge billig hergestellt werden. Im Gegensatz zu vielen viralen Lebendimpfstoffen können bakterielle Lebendimpfstoffe prinzipiell auch ohne Kühlung gelagert werden [248]. Somit sind ihre Herstellungskosten geringer anzusetzen als die von Lebendviren.
2. Da zu ihrer Anzucht keine Säugerzellen benötigt werden, wird die Gefahr einer Verunreinigung der Impfstoffe und damit auch die unbeabsichtigte Inokulation von Impfungen mit Fremdviren vermieden [34]. Sollte es aber trotzdem zu einer Infektion des Impflings z. B. aufgrund einer unerkannten Immunschwäche mit dem Impfstamm kommen, ist bei der Verwendung von Bakterien im Gegensatz zu viralen Vektoren prinzipiell die Möglichkeit einer effektiven antibiotischen Therapie gegeben [97]. Daher haben bakterielle Träger ein günstigeres Sicherheitsprofil als virale Systeme.
3. Bei Verwendung geeigneter Plasmidvektoren können in Bakterien außerdem auch sehr große Antigene oder mehrere verschiedene Antigene in Form eines Fusionsproteins synthetisiert werden, die Größenlimitation ist hier weniger streng wie in viralen Vektoren [171].

Als Trägerbakterien wurden bisher sowohl attenuierte pathogene als auch kommensale Bakterien verwendet [91,221]. Sehr vielversprechend ist die Verwendung von attenuierten enteropathogenen Bakterien wie z. B. die von attenuierten *Salmonella* spp., *Shigella* spp. oder auch *Listeria monocytogenes*, da sie im Gegensatz zu kommensalen Bakterien ausreichend immunogen sind und auch oral in Form einer Schluckimpfung verabreicht werden können [171]. Wenn gleich auch noch nicht so ausführlich wie *Salmonella* spp. und *Shigella* spp., ist auch *L. monocytogenes* als Träger heterologer Impfstoffe untersucht und in Tiermodellen eingesetzt worden, da Listerien eine Reihe von Eigenschaften besitzen, die sie für den Einsatz als Träger heterologer Impfstoffe besonders interessant machen [73].

## **2.9 *Listeria monocytogenes***

### **2.9.1 Allgemeine Mikrobiologie und Pathogenese**

Alle Listerien kommen in der Natur (Erdboden, Wasser, Pflanzen, Tiere) weit verbreitet vor sowie im Darm von Haus- und Wildtieren wie auch des Menschen (eine ausführliche Übersicht zur Infektionsbiologie von *L. monocytogenes* findet sich in [346]). Sie sind eine Gattung grampositiver, beweglicher, nicht-sporenbildender Stäbchenbakterien, die sich aerob und anaerob vermehren. *L. monocytogenes* und die seltenere Art *L. ivanovii* sind die einzigen unter den bisher sechs bekannten Arten dieser Gattung, die als fakultativ human- und tierpathogene Spezies anzusehen sind. Da sie bemerkenswert resistent sind gegenüber konventionellen nahrungsmittelkonservierenden Techniken [172], sind kontaminierte Lebensmittel potentielle Hauptüberträger von Listerien [9].

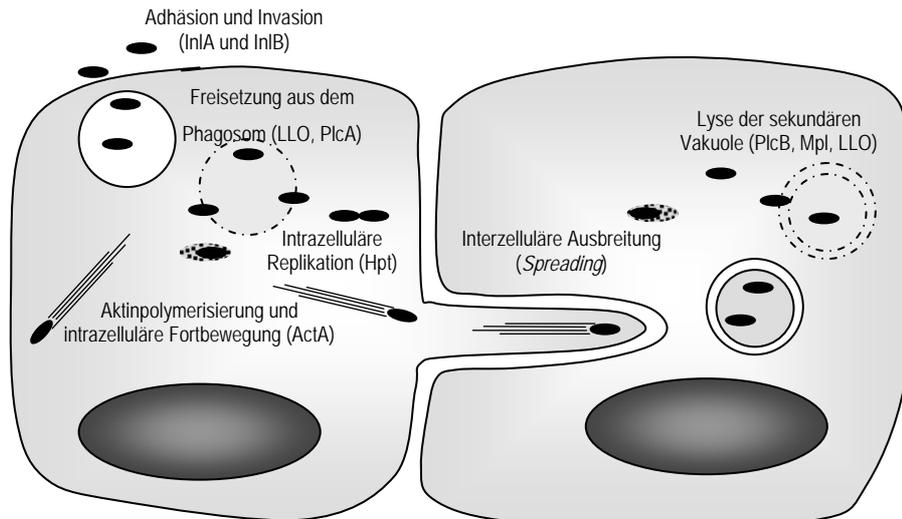
Aufgrund ihrer Stabilität gegen Säuren können sie die Magenpassage überstehen und nach oraler Aufnahme über die Darmmukosa in den Wirt eindringen. Anhand von Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* in der Lage ist, seine direkte Aufnahme in humane Enterozyten selbst zu induzieren [102]. Daneben sprechen Befunde aus Tierversuchen DC in den

Peyer'schen Plaques (PP) des Dünndarms eine zentrale Rolle bei der Invasion des Wirtsorganismus zu [270]. Diese Plaques besitzen als Bestandteil des Immunsystems wichtige Funktionen in der lokalen Immunabwehr und sind reich an APC und Lymphozyten [165]. Damit dienen DC aber auch als Vektoren, welche die Bakterien aus dem Darmlumen über das Darmepithel und in tiefere Gewebe transportieren können [269]. Nach Überwindung der intestinalen Barriere kommt es zu einer hämatogenen bzw. lymphogenen Dissemination entweder in Form freier Bakterien [61] oder im Zytoplasma von professionellen phagozytischen Zellen wie z. B. M $\Phi$  [76] in die mesenterialen Lymphknoten sowie in Milz und Leber. In der Milz erfolgt die Aufnahme von *L. monocytogenes* v. a. durch M $\Phi$  und DC in den Marginalzonen der weißen Pulpa [51]. In der Leber wird die Mehrheit der Bakterien zunächst von Gewebsmakrophagen (Kupffer'sche Sternzellen) und vor allem neutrophilen Granulozyten (engl. *polymorph nuclear granulocytes*, Abk. PMN) phagozytiert und abgetötet [364]. Ein Teil der Bakterien jedoch entgeht diesem ersten Abwehrmechanismus und kann sich entweder im Zytoplasma infizierter Makrophagen vermehren, oder nach Freisetzung aus zerstörten M $\Phi$  sowie durch direkte Zell-zu-Zell-Übertragung mittels *spreading* in benachbarte Hepatozyten eindringen und sich in deren Zytosol stark vermehren. Dies führt zur Apoptose der infizierten Hepatozyten [280] sowie zur weiteren Rekrutierung phagozytischer Zellen durch Freisetzung chemotaktischer Botenstoffe [52]. Die Einwanderung von PMN an die Orte der Infektion in der Akutphase der Listeriose führt zur Entstehung von Mikroabszessen in der Leber durch die Elimination infizierter Hepatozyten [53]. Wird die Vermehrung im weiteren Verlauf nicht durch die Induktion einer adäquaten, v. a. zellulären spezifischen Immunantwort kontrolliert, so kann es von der Leber aus zu einer hämatogenen Dissemination und in Folge dessen zu einer Sepsis und dem Befall anderer Organe wie Gehirn und Uterus kommen [202].

### 2.9.2 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren

*L. monocytogenes* ist ein invasives Pathogen, welches zum einen eine Reihe von professionell phagozytischen Zellen wie M $\Phi$  [208] und DC [127,169,245] infiziert, zum anderen aber auch seine Internalisierung in eine Vielzahl von Zelltypen induzieren kann, welche normalerweise selbst nicht phagozytisch sind wie z. B. epitheliale Zellen [102] und Hepatozyten [367] (Übersichtsartikel zur zellulären Mikrobiologie der Listeriose in [58,264]).

Für die Adhäsion und Invasion von nicht-professionell phagozytischen Zellen wie z. B. humanen Colonepithel- oder Leberzellen sind vor allem die Genprodukte von *inIA* [101] und *inIB* [28] von Bedeutung. Das von *inIA* kodierte Protein Internalin A ist über ein C-terminales LPXTG-Ankermotiv kovalent mit dem Peptidoglykan der bakteriellen Zellwand verknüpft und bindet an das humane E-Cadherin auf der Oberfläche der Colonepithelzellen [222]. Das humane E-Cadherin besitzt an Position 16 einen Prolinrest, das murine hingegen einen Glutamatrest. Dies hat zur Folge, dass InIA nicht an das murine E-Cadherin binden kann [185]. Wird aber dieser Glutamatrest im murinen E-Cadherin durch ein Prolin ersetzt, erlaubt dies auch die orale Infektion eines entsprechenden transgenen Mausstammes [186]. Im Gegensatz zu InIA ist InIB nicht-kovalent in der bakteriellen Zellwand verankert und bindet an Rezeptoren auf der Oberfläche von Leberzellen wie gC1qR und *Hepatocyte-Growth-Factor*-Rezeptor [301].



**Abbildung 2.1:** Zelluläre Mikrobiologie einer Infektion mit *L. monocytogenes*.

Eine Reihe von Oberflächen- und sezernierten Proteinen ermöglicht es *L. monocytogenes*, an Zelloberflächen zu adhären, in die Zelle einzudringen, aus dem Phagosom zu entkommen und sich im Zytoplasma der infizierten Zelle zu vermehren sowie sich darin fortzubewegen. Internalin A (InlA) und InlB vermitteln die Adhäsion an eine Vielzahl epithelialer Zellen. Nach Aufnahme der Bakterien durch die Wirtszelle ist Listeriolysin (LLO) für die Auflösung der phagosomalen Membran verantwortlich. Sobald die Bakterien in das Zytoplasma der Wirtszelle eingedrungen sind, wird das *Actin-Assembly-Inducin*-Protein (ActA) an einem Pol der bakteriellen Zelle exprimiert und verursacht eine Polymerisation des Wirtszellaktins zu einem polaren Aktinschweif mit dessen Hilfe sich *L. monocytogenes* dann durch das Wirtszellzytoplasma fortbewegt und unter Umgehung des Extrazellulärraums direkt in benachbarte Zellen eindringen kann. Dieser Vorgang wird auch als *spreading* bezeichnet. Um sich anschließend aus der sekundären Vakuole der so neuinfizierten Zelle zu befreien, exprimiert *L. monocytogenes* die phosphatidylspezifische Phospholipase B (PlcB), eine sezernierte Zinkmetalloprotease (Mpl) sowie LLO. (Abbildung modifiziert aus [244])

Nach dem Eindringen in die Zelle befinden sich die Listerien zunächst im Phagosom. Zur Befreiung der Listerien aus dem Phagosom sind das porenformende Toxin Listeriolysin O (LLO) sowie die bakterielle Phosphatidylinositolphospholipase C (PlcA) notwendig. Diese werden von den Genen *hly* bzw. *plcA* codiert und von den Bakterien bereits während des Aufenthaltes im phagosomalen Kompartiment stark exprimiert [32]. Listerien besitzen darüber hinaus eine Reihe von weiteren Stoffwechselanpassungen wie z. B. den Besitz eines Hexose-6-phosphattransporters (Hpt) [44], die es ihnen ermöglichen, sich im Zytosol der infizierten Wirtszelle mit einer Generationszeit von ca. 40 min zu vermehren. Mit Hilfe des *Actin-Assembly-Inducin* (ActA)-Proteins organisieren sie schließlich an einem ihrer Zellpole die Ausbildung eines Aktinschweifes und gelangen mit dessen Hilfe zur Zellperipherie, wo sie die Ausbildung pseudopodienartiger Ausstülpungen induzieren. Diese Pseudopodien penetrieren benachbarte Zellen und werden von diesen phagozytiert, wodurch ein von einer Doppelmembran umschlossenes sekundäres Phagosom entsteht. Anschließend können sich einige Listerien durch einen weiteren Lysevorgang aus dieser Vakuole erneut befreien und in das Zytoplasma der neu infizierten Zellen entkommen, wodurch es zu einer interzellulären Ausbreitung der Bakterien im Gewebe kommt. Für die effiziente Lyse des sekundären Phagosoms ist neben LLO das Genprodukt von *plcB* notwendig, das durch das Produkt von *mpl* in die enzymatisch aktive Form überführt wird.

Die meisten Virulenzgene sind auf einer Pathogenitätsinsel (LIPI-1) von ca. 10 kB Größe im Genom von *L. monocytogenes* lokalisiert, welche im Genom der nicht-pathogenen *Listeria spp.* nicht existiert [346]. Diese besteht aus den sechs Genen *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB* sowie drei weiteren kleinen offenen Leserahmen (ORF X, Y und Z) stromabwärts von *plcB*. Alle bekannten Virulenzgene stehen unter der transkriptionellen Kontrolle des pleiotropen Aktivatorproteins PrfA. Andere PrfA-regulierten Virulenzgene sind zum Teil in Form von Operons an anderen Stellen des Genoms lokalisiert wie z. B. die Internalingene *inIA* und *inIB* in Form sogenannter „Internalininseln“ [346].

### **2.9.3 Interaktion von *L. monocytogenes* mit antigenpräsentierenden Zellen und Induktion einer Immunantwort**

In die Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes* sind sowohl angeborene als auch erworbene Abwehrmechanismen involviert, wobei die zelluläre Immunität eine zentrale Rolle spielt [244].

Die angeborene Immunantwort umfasst eine Vielzahl von Zelltypen und Zytokinen. Nach Infektion mit *L. monocytogenes* können endotheliale wie epitheliale Zellen die angeborene Immunantwort über die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine effektiv aktivieren sowie durch Apoptose der intrazellulären Replikation der Listerien entgegenwirken und diese damit den Abwehrmechanismen des angeborenen wie auch des spezifischen Immunsystems aussetzen. In der humanen Colonepithelzelllinie Caco-2 beispielsweise kommt es nach Infektion *in vitro* zu einer starken Induktion von NF- $\kappa$ B und damit innerhalb von 7 h nach Infektion auch zu einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  [12,156]. Ferner gehen bis zu 30% aller Caco-2-Zellen innerhalb von 24 h nach Infektion infolge zytotoxischer Effekte der Infektion in die Apoptose [342]. Auch Hepatozyten gehen *in vivo* innerhalb von 24 h und *in vitro* bereits innerhalb von 4-8 h in die Apoptose [280] und setzen nach INF- $\gamma$ -Stimulation TNF- $\alpha$  frei [327]. Durch Infektion mit *hly*-, *plcA*-, *plcB*- und *inIB*-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass diese Effekte durch LLO verursacht werden [164,281]. Polymorphkernige Neutrophile (PMNs), die in den ersten 24 Stunden der Infektion infizierte apoptotische Hepatozyten und dadurch freigesetzte Bakterien in der Leber eliminieren [280], zeigen *in vitro* nach Phagozytose von *L. monocytogenes* einen raschen und starken Anstieg an reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROI) sowie innerhalb von 3-6 h ebenfalls eine Aktivierung von Genen für proinflammatorische Zytokine und Chemokine [166]. Schließlich werden aber auch PMNs *in vitro* nach Infektion mit *L. monocytogenes* apoptotisch [166]. Auch für die Aktivierung von PMNs scheint LLO von zentraler Bedeutung zu sein [304].

Neben PMN sind für die Eliminierung der Bakterien vor allem M $\Phi$  von entscheidender Bedeutung. So sezernieren in der frühen Phase der Infektion NK- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auf einen TNF- $\alpha$ - und IL-12-Stimulus hin große Mengen IFN- $\gamma$  [16,340]. Zusätzlich wurde *in vivo* beobachtet, dass auch TNF- $\alpha$ - und Stickstoffmonoxid (NO)-produzierende DC aus der Milz, sogenannte TipDC, in der frühen Phase der Infektion für eine effiziente Aktivierung von M $\Phi$  von zentraler Bedeutung sind [330]. Die Induktion der proinflammatorischen Cytokine IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-12 und TNF- $\alpha$  in infizierten M $\Phi$  [67,173] wiederum führt zu einer Aktivierung weiterer PMN und bewirkt so eine weitere Stimulierung der IFN- $\gamma$ -Produktion durch NK-Zellen [340]. Diese positive Rückkopplung führt schließlich zu einer gesteigerten Synthese

von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten (NOI) in den infizierten M $\Phi$ . Derart aktiviert sind sie in der Lage, *L. monocytogenes* am Freikommen aus der phagozytischen Vakuole zu hindern und somit verstärkt abzutöten sowie listerielle Antigene effizienter zu präsentieren [234]. Um diesen wichtigen Mechanismen der Immunantwort entgegenzuwirken, verursachen die Listerien eine Herabregulierung des TNF-Rezeptors Typ I und des IFN- $\gamma$ -Rezeptors [67] sowie eine verminderte Expression von MHC-I- und -II-Molekülen in infizierten M $\Phi$  nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  [294].

Neben ihrer Rolle als Effektorzellen spielen M $\Phi$  auch eine wichtige Rolle als APC in der Induktion einer spezifischen T-Zellimmunität. Allerdings ist das Wechselspiel zwischen *L. monocytogenes* und APC sowohl im Falle der M $\Phi$  als auch von DC sehr komplex und derzeit nur unvollständig verstanden. Die Aufnahme von *L. monocytogenes* durch murine M $\Phi$  [4,77] und humane DC [169] wird durch opsonisierende Serumbestandteile wie Antikörper oder Komplementfaktoren über ihre Bindung an Komplement- und Fc- $\gamma$ -Rezeptoren vermittelt. Außerdem können zumindest M $\Phi$  auch in der Abwesenheit von Komplement über den Scavenger-Rezeptor mit bakteriellen Lipoteichonsäuren (LTA) interagieren [78] und damit Bakterien auch komplementunabhängig phagozytieren [152,331]. Die phagozytierten Listerien bzw. Peptide von antigenen Proteinen wie z. B. LLO und P60 werden sowohl in den MHC-I-Präsentationsweg als auch in den MHC-II-Präsentationsweg eingespeist und nach Antigenprozessierung entsprechenden CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert [109]. Parallel zu den Vorgängen der Antigenpräsentation kommt es in M $\Phi$  nach Aufnahme der Bakterien innerhalb weniger Minuten auch zur Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionswege [117]. Die Erkennung listerieller PAMPs erfolgt zum einen wahrscheinlich durch TLRs wie z. B. TLR 2 auf der Oberfläche der M $\Phi$  [94,335]. Allerdings konnte die Bedeutung von TLR2 für die Abwehr einer experimentellen Listerieninfektion im murinen Modellsystem noch nicht eindeutig geklärt werden [178,240,335]. Daneben scheinen auch zytoplasmatische PRR wie z. B. die *Nucleotide-Binding-Oligomerization-Domain* (NOD)-Proteine in der Lage zu sein, Bestandteile intrazellulärer Listerien erkennen und eine Wirtszellantwort aktivieren zu können [216,317]. Beide führen unter anderem zur Aktivierung und Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern [136,242] und zur Transkription zahlreicher Gene wie z. B. die von NF- $\kappa$ B, Hitzeschockproteinen, Typ-I-Interferonen, sowie der von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  oder IL-12 und von Chemokinen [49,216,295]. Im Kontext diese Zytokine findet dann die Präsentation listerieller Epitope an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen statt. Schließlich führt die Infektion von M $\Phi$  mit *L. monocytogenes* zumindest *in vitro* nach 12 h zum nekrotischen Tod von über 70 % aller infizierten Zellen [15]. Da aber listerielle Antigene aus nekrotischen M $\Phi$  von DC aufgenommen und über den alternativen MHC-I-Präsentationsweg CD8<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert werden, können somit auch nekrotische M $\Phi$  zu einer verstärkten MHC-I-Antigenpräsentation *in vivo* beitragen [244].

Neben M $\Phi$  sind DC im murinen Listeriosemodell von zentraler Bedeutung insbesondere für das CD8<sup>+</sup>-T-Zellpriming [157]. Im Vergleich zu M $\Phi$  liegen zur Interaktion von DC mit *L. monocytogenes* allerdings erst wenige Daten vor. Auch hier scheinen TLR in der Erkennung von *L. monocytogenes* durch murine DC und der Induktion einer Wirtszellantwort eine Rolle zu spielen [198]. Dadurch kam es

nach Aufnahme der Listerien zu einer Reifung der infizierten DC und damit verbunden zu einer gesteigerten Expression kostimulatorischer Moleküle wie z. B. CD40, CD80 und CD86 sowie einer Reihe von Zytokinen wie IL-12 und TNF- $\alpha$  [31,199]. Insbesondere die frühzeitige und massive Produktion von IFN- $\beta$  durch listerieninfizierte DC führt zu einem effektiven T-Zellpriming und der Induktion einer T<sub>H</sub>1-basierten und CTL-vermittelten spezifischen Immunantwort [89]. Hierfür war insbesondere der Eintritt der Listerien in das Zytoplasma der infizierten Zelle wichtig und damit wieder die bakterielle Expression von LLO [31,89]. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass LLO unabhängig von seiner zytolytischen Aktivität in murinen DC zu einer Apoptose der infizierten Zelle führt [126]. Allerdings scheint in humanen DC die Interaktion zwischen *L. monocytogenes* und DC etwas anders zu verlaufen, da es zwar auch hier zu einer Reifung der infizierten Zelle kommt, aber nicht zu ihrer Apoptose und die Bakterien zum Teil im Phagosom abgetötet werden [169,245].

Die adaptive Immunantwort gegen *Listeria* wird im wesentlichen von CTL und T<sub>H</sub>1-Zellen getragen [181]. Aber auch IL-4 produzierende T<sub>H</sub>2-Zellen können am Beginn einer *Listeria*-Infektion oder in verschiedenen Geweben im Verlauf einer Infektion gemessen werden [215,299,323]. Bemerkenswerterweise ist das Priming spezifischer CTL [11,223] und T<sub>H</sub>1-Zellen [56,190] innerhalb der ersten 24 h einer Infektion mit *L. monocytogenes* abgeschlossen und unabhängig von der Menge vorhandener Listerien oder der Dauer der Infektion [56,190,366]. Die nach Antigenpräsentation resultierende Aktivierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen führt zu einer völligen Eliminierung der Listerien aus dem Wirt. Zudem konnte gezeigt werden, dass neben der zellulären Immunität auch LLO-spezifische, neutralisierende Antikörper eine Protektion gegen *Listeria* vermitteln können [80,82], wenngleich diese von eher untergeordneter Bedeutung sein dürften. Als Ergebnis einer subletalen Infektion werden schließlich spezifische CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Gedächtniszellen gebildet [11,56,190,223], welche einen andauernden Schutz gegen eine Zweitinfektion vermitteln und bei einer erneuten Infektion schneller eine spezifische Immunantwort auslösen können.

## **2.10 *L. monocytogenes* als Impfstoffträger**

Neben den bereits in Abschnitt 2.8 aufgeführten generellen Vorteilen von Bakterien als Träger heterologer Vakzine besitzt *L. monocytogenes* somit noch eine Reihe spezifischer Eigenschaften, die es als Träger heterologer Protein- und DNA-Vakzine besonders interessant machen:

1. Ihr Genom ist vollständig sequenziert [114] und es steht ein umfangreiches Repertoire an Methoden für ihre genetische Manipulation bereit. Damit ist die Herstellung attenuierter Mutanten, die entweder Deletionen in Stoffwechselgenen oder in Virulenzgenen enthalten, vergleichsweise einfach. Darüber hinaus stehen bereits zahlreiche attenuierte Stämme zur Verfügung [73].
2. Als grampositives Bakterium besitzt es im Gegensatz zu gramnegativen Bakterien kein Lipopolysaccharid (LPS), welches als einer der potentesten Auslöser eines septischen Schocks gilt, der bei Infektionen mit gramnegativen Erregern besonders gefürchtet ist [159].
3. Außerdem führt die Infektion von DC mit *L. monocytogenes* zu einer ungleich stärkeren Synthese des für die Aktivierung naiver T-Zellen wichtigen IFN- $\beta$  als die Behandlung der Zellen mit dem LPS gramnegativer Bakterien [89]. Somit kommt es möglicherweise durch

Infektion mit *L. monocytogenes* zu einem sehr viel effektiveren T-Zellpriming als durch Infektion mit gramnegativen Bakterien wie z. B. *Salmonella* spp.

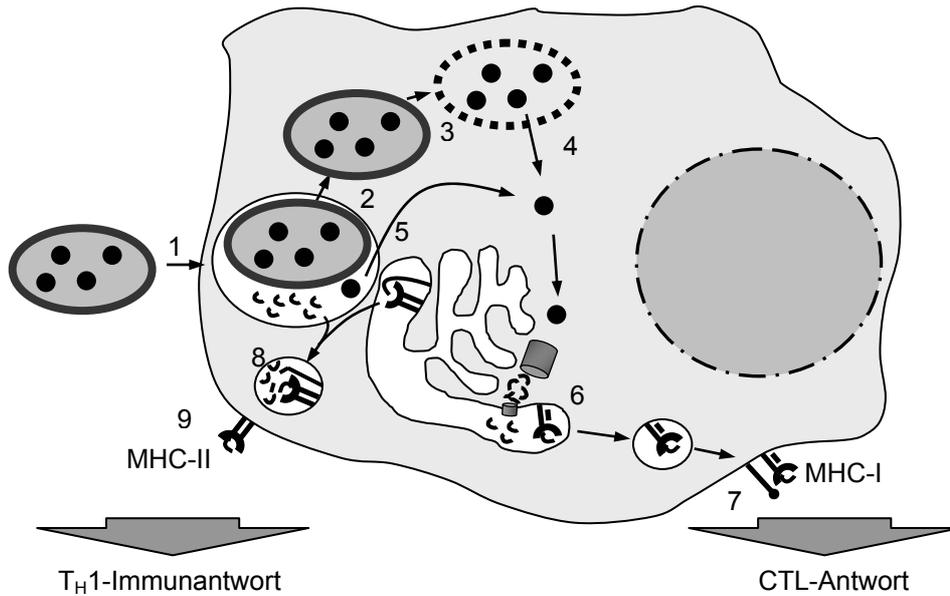
4. Listerien besitzen als bakterielle Darmpathogene einen natürlichen Tropismus für DC [269] und sind somit nach oraler Applikation für die Erzeugung einer mukosalen Immunität besonders gut geeignet [149,176,177,263].
5. Da *L. monocytogenes* als fakultativ intrazellulärer Erreger eine starke CTL- und T<sub>H</sub>1-basierte Immunreaktion erzeugt, ist es als potentieller Vakzineträger zur Erzeugung von Impfstoffen gerade gegen intrazelluläre Erreger und Tumoren besonders geeignet [73,249].
6. Im Gegensatz z. B. zum Einsatz von *Salmonella* spp. als Vakzineträger scheint eine gegen *L. monocytogenes* bestehende Immunität nicht die Induktion einer Immunantwort gegen das zu übertragende heterologe Antigen zu beeinträchtigen [26,310,315].
7. Schließlich ergaben sich in einer Phase-I-Studie keine nachteiligen Effekte für die Probanden nach einer oralen Infektion mit einer  $\Delta actA\Delta plcB$ -Doppelmutante [7], die im Tiermodell ebenfalls stark virulenzattenuiert war und dennoch eine starke CTL-Anwort auszulösen vermochte [63,251]. Somit sind virulenzattenuierte Listerienmutanten im Prinzip auch im Menschen als Vakzineträger sicher und potentiell immunogen.

Daher ist *L. monocytogenes* auch schon in einer Reihe unterschiedlicher Tiermodelle wie z. B. in Mäusen [224,252], Katzen [314,315] und Rhesusaffen [27] sowohl zur Expression heterologer Antigene, als auch zur Übertragung von DNA-Vakzinen z. B. gegen HIV [27,314] oder *M. tuberculosis* [224] eingesetzt worden.

Das generelle Schema einer Übertragung von Proteinantigenen und Vakzineplasmiden auf antigenpräsentierende Zellen mittels *L. monocytogenes* zeigen die Abbildungen 2.2 und 2.3.

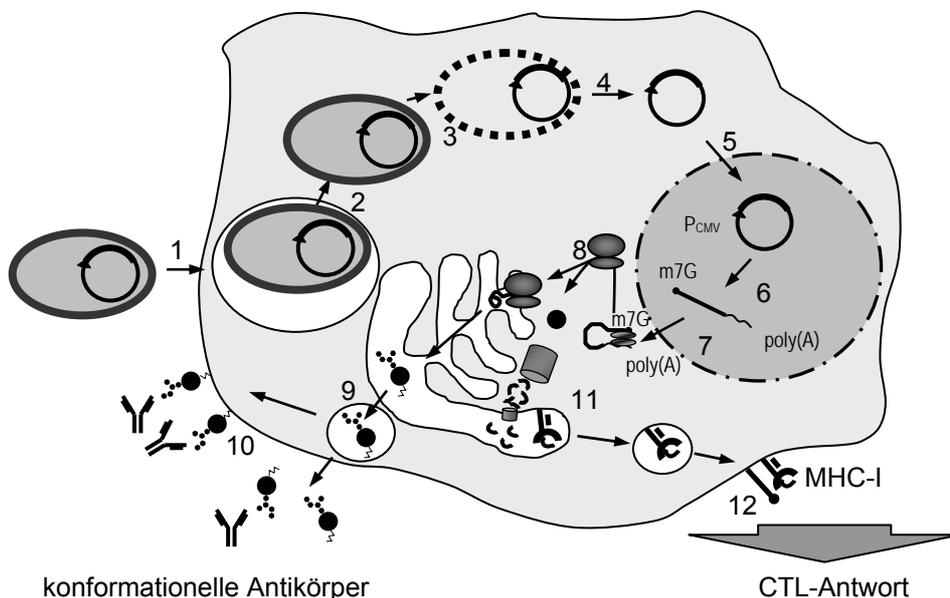
### **2.10.1 Expression heterologer Antigene in *L. monocytogenes* am Beispiel von HIV**

Die Erzeugung einer mukosalen Immunität ist für den Schutz vor einer sexuellen Übertragung von HIV von zentraler Bedeutung [347]. Die Erzeugung einer dauerhaften mukosalen Immunität setzt ein mukosales Priming voraus und führt auch zu einer systemischen Immunität. Daher sind mukosale Prime-Boost-Impfstrategien am besten geeignet, um vor einer Infektion mit Erregern wie HIV-1 zu schützen. Gerade die Erzeugung einer potenten zellulären wie auch mukosalen Immunantwort macht *L. monocytogenes* so zu attraktiven Trägern eines oral applizierbaren Impfstoffes gegen HIV [196,250]. So konnte in Primaten wie den Rhesusaffen gezeigt werden, dass oral applizierte, rekombinante und das SIV-Capsidprotein Gag bzw. das Hüllprotein Env exprimierende *L. monocytogenes* eine effektive zelluläre Immunantwort auszulösen vermögen [27]. Im Rahmen eines Prime-Boost-Impfansatzes waren sie als Booster-Impfung ferner in der Lage, die Immunantwort auf eine Prime-Impfung mit einem *env*- bzw. *gag*-DNA-Impfstoff so zu verstärken, dass die Replikation von SIV in den geimpften Affen signifikant herabgesetzt werden konnte [27]. Allerdings war die Immunisierung nicht protektiv und es wurde auch keine mukosale Immunität gemessen.



**Abbildung 2.2:** Schema der bakteriellen Übertragung von Antigenen mittels *L. monocytogenes*.

Der Prozess der bakteriellen Übertragung von Proteinantigenen kann in mehrere Stufen eingeteilt werden: 1) Invasion der Wirtszelle. 2) Freisetzung der Bakterien aus dem Phagosom. 3) Lyse der Bakterienzelle im Zytoplasma. 4) Freisetzung des Antigens in das Zytoplasma der Wirtszelle. 5.) Alternativ in DC auch Transport von freigesetzten Antigenen aus dem Phagosom direkt in den MHC-I-Präsentationsweg. 6.) Abbau des zyttoplasmatischen Proteins im Proteasom und Transport der Peptide durch den TAP-Transporter in das ER sowie dort Beladung von MHC-I-Molekülen mit den abgeleiteten Peptiden/Epitopen. 7.) Präsentation der Epitope im Kontext von MHC-I-Molekülen. 8.) Beladung von MHC-II-Molekülen mit Antigenpeptiden nach phagosomalen Abbau und 9.) Präsentation der Peptide durch MHC-II-Moleküle.



**Abbildung 2.3:** Schema der bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA (blau) und Weiterverarbeitung des codierten Antigens (grün) in APC.

Analog der Übertragung von Proteinantigenen kann auch der Prozess der bakteriellen Übertragung von antigencodierenden Nukleinsäuren in mehrere Stufen eingeteilt werden: 1) Invasion der Wirtszelle. 2) Freisetzung der Bakterien aus dem Phagosom. 3) Lyse der Bakterienzelle. 4) Freisetzung der Nukleinsäuren in das Zytoplasma der Wirtszelle. 5.) Import der Plasmid-DNA in den Zellkern. 6) Transkription des plasmidcodierten Antigens. 7) Export der prozessierten mRNA aus dem Zellkern. 8) Translation der mRNA am eukaryontischen Ribosom. 9) Posttranslationale Modifikationen von sezernierten Proteinen oder Membranproteinen im ER. 10) Sekretion bzw. Membranlokalisierung des modifizierten Antigens. 11) Abbau des zyttoplasmatischen Proteins im Proteasom und Transport der Peptide durch den TAP-Transporter in das ER sowie dort Beladung von MHC-I-Molekülen mit den abgeleiteten Peptiden/Epitopen. 12) Präsentation der Epitope im Kontext von MHC-I-Molekülen.

Generell hat die Art der Expression durch die Trägerbakterien einen großen Einfluss auf die Art und Stärke der gegen das heterologe Antigen gerichteten Immunantwort [162,243]. Wurden verschiedene Modellantigene in einer sezernierten Form exprimiert, so war die Immunantwort im Tiermodell in der Regel stärker als bei intrabakterieller Lokalisation des Antigens. Gegenüber den beiden genannten Verfahren hat die Verankerung heterologer Antigene in der Oberfläche der Trägerbakterien den potentiellen Vorteil, dass diese so einer Erkennung durch Immunzellen leichter zugänglich sind [110] und führte in einer Reihe von unterschiedlichen Ansätzen zur Erzeugung einer zum Teil protektiven, humoralen wie zellulären Immunantwort [122,188,237]. Beispielsweise wurde auf der Suche nach einem mukosal applizierbaren Impfstoff gegen HIV-1 ein Teil des Gp120-Hüllproteins in der Zellwand des kommensalen grampositiven Bakteriums *Streptococcus gordonii* kovalent verankert. Nach vaginaler Immunisierung von Cynomolgusaffen mit diesem rekombinanten Impfstamm kam es zur Bildung von IgA-Antikörpern in der Vagina sowie auch von IgG-Antikörpern und antigenspezifischen T-Zellen im Serum der immunisierten Affen und damit neben einer lokalen auch zu einer relevanten systemischen Immunantwort [70]. Allerdings wurden hier keine zellulären Immunantworten gemessen.

Daher wäre die Verankerung von Antigenen auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* eine attraktive Alternative zur Erzeugung einer sowohl mukosalen wie auch systemischen zellulären Immunantwort gegen HIV.

### **2.10.2 Bakterielle Übertragung von DNA-Vakzinen mit Hilfe von *L. monocytogenes***

Neben CTLs spielen auch neutralisierende Ak eine wesentliche Rolle in der Immunität gegen HIV [107]. Konformationelle Epitope des HIV-1-Hüllproteins Env bzw. von dessen für die Bindung an die Rezeptoren der Zielzellen verantwortlichen Abschnitts Gp120 zum Beispiel induzieren protektive Antikörper, die auch an eine Vielzahl von Varianten dieser Proteine binden und damit auch HIV-Mutanten neutralisieren können [68,97]. Allerdings können weder Env noch Gp120 in ihrer nativen Konformation in Bakterien exprimiert und damit im Zusammenhang mit bakteriellen Trägern auch nicht als heterologes Antigen verwendet werden [98,99]. Generell lassen sich eukaryontische Proteine nur schlecht in Bakterien in größerer Menge und in ihrer nativen Konformation produzieren und zudem sind die posttranslationalen Proteinmodifikationen in Prokaryonten grundsätzlich verschieden von denen in eukaryontischen Zellen [171]. Einen Ausweg stellt die Übertragung von antigencodierenden Plasmiden auf eukaryontische Zellen mittels Bakterien dar (Übersichtsartikel in [74,201,293]), da hierbei die Bakterien nicht selbst das Antigen synthetisieren, sondern wie im Falle einer Impfung mit Plasmid-DNA die eukaryontische Wirtszelle. Diese Art der Übertragung von eukaryontischen Expressions- bzw. Vakzinierungsplasmiden auf eukaryontische Zellen mit Hilfe von geeigneten Trägerbakterien wird auch als Baktiofektion bezeichnet [246]. Die Verwendung fakultativ intrazellulärer Erreger, die auch in das Zytoplasma der infizierten Zellen eindringen können, erlaubt die gezielte Übertragung von Vakzine-Plasmiden auf APC. Daher wurden neben attenuierten *Salmonella* spp. [62] insbesondere attenuierte *Shigella* spp. [59,306], invasive *E. coli* [59,120] und *L. monocytogenes* [72] verwendet.

Im Falle von *L. monocytogenes* enthielt das eingesetzte und für ein Reporter-gen codierende Vakzine-Plasmid noch zusätzlich das Endolysingen *ply118* des Bakteriophagen A118 unter der Kontrolle des listeriellen *actA*-Promotors [72]. Da dieser Promotor besonders stark im Zytoplasma der Zelle aktiv ist, sollte dies zu einer zielgerichteten intrazytoplasmatischen Lyse der Bakterien führen. In der Tat konnte dabei in den murinen M $\Phi$ -Zelllinien J774A.1 und P388D.1 eine teilweise Lyse der Bakterien durch das Phagenlysin beobachtet werden und parallel dazu eine deutliche Virulenzattenuation des betreffenden Stammes in Versuchsmäusen [72]. Während sich außerdem verschiedene nicht-professionell phagozytische Zelllinien mit Hilfe dieses Stammes *in vitro* moderat transfizieren ließen, schienen primäre M $\Phi$  und DC allerdings fast unzugänglich für einen *Listeria*-vermittelten Gentransfer zu sein [72,119,140]. Ferner konnte im Rahmen dieser Arbeiten auch die Integration von eukaryontischen Expressionsplasmiden mit einer Frequenz von  $10^{-7}$  in das Genom der Wirtszellen beobachtet werden [72]. Neben der Übertragung von Plasmiden mittels *L. monocytogenes in vitro* gelang auch der Nachweis einer Plasmidübertragung auf Peritonealmakrophagen *in vivo* nach einer intraperitonealen Applikation eines *L. monocytogenes*-Stammes, der mit dem oben erwähnten, für das Phagenlysin codierenden Vakzineplasmid ausgestattet war [309]. Aufbauend auf diesen Arbeiten konnte schließlich auch mit einem sehr ähnlichen System in einem Mausmodell der Tuberkulose sowohl die Übertragung des Vakzineplasmids als auch die Expression der plasmidcodierten *M. tuberculosis*-Antigene und die Induktion einer effizienten Immunantwort gegen *M. tuberculosis* nach intravenöser wie auch intraperitonealer und oraler Applikation des verwendeten *L. monocytogenes*-Trägerstammes nachgewiesen werden [224].

Und auch auf der Suche nach neuartigen HIV-Impfstoffen wurde die Übertragung von DNA-Vakzinen mit Hilfe von rekombinanten *L. monocytogenes* näher untersucht. So führte bereits einer einmalige orale Impfung von Versuchskatzen mit einem rekombinanten *L. monocytogenes*-Stamm, der zum einen das FIV-Capsidprotein Gag exprimiert und gleichzeitig als DNA-Vakzine ein eukaryontisches Expressionsplasmid enthielt, welches für Abschnitte des FIV-Hüllproteins Env codierte und somit die Synthese von korrekt prozessiertem Env durch eukaryontische Zellen ermöglichte, in einem - wenn auch kleinen - Teil der immunisierten Tiere nach intravaginaler Challengeinfektion mit FIV zu einer begrenzten Kontrolle der FIV-Replikation [314]. Eine bestehende Immunität gegen Listerien hatte dabei keinerlei Beeinträchtigung der Wirksamkeit der Listerien als Trägerbakterien des rekombinanten FIV-Impfstoffes zur Folge [315].

Da derartige Vakzinierungsplasmide aber in aller Regel *in vivo* von den Trägerbakterien in Abwesenheit eines antibiotischen Selektionsdrucks wieder schnell verloren werden, wurde für *L. monocytogenes* ein so genanntes *balanced-lethal*-Plasmidsystem etabliert [254,255]. Dabei wurde das für die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase-codierende essentielle Gen *trpS* im Chromosom von *L. monocytogenes* deletiert und gleichzeitig eine *trpS*-Expressionskassette in das Vakzinierungsplasmid inseriert [254,255]. Bei Verlust des Plasmids besitzt *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  keine funktionale Kopie des *trpS*-Gens mehr und ist somit nicht lebensfähig. Aufgrund seiner Stabilisierung dienten daher Plasmid pSP0 und seine Derivate als Ausgangsvektoren für die Konstruktion von prokaryontischen

Expressionsplasmiden zur Synthese zellwandverankerter Antigene in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  sowie für die Konstruktion eukaryontischer Expressionsvektoren.

### 2.11 Experimenteller Ansatz

Zur genaueren Untersuchung der bakteriellen Expression von zellwandverankerten Antigenen sowie zur zellbiologischen Analyse des Baktinfektionsprozesses wurden Zellkulturversuche mit verschiedenen humanen und murinen Zelllinien durchgeführt. Im Vergleich zu Tierversuchen bieten Zellkulturversuche die Möglichkeit, die zellbiologischen Prozesse im molekularen Detail und unter kontrollierten Randbedingungen zu untersuchen und damit eine rationale Grundlage für darauf aufbauende Vakzinierungsexperimente im Tiermodell zu liefern.

Als Modellantigen diente zum einen das grünfluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* [267] bzw. die für die Expression in eukaryontischen Zellen adaptierte Variante EGFP [375]. Nach Translation und spontaner Faltung von GFP entsteht die chromophore Gruppe über eine Ringbildung und Oxidation eines Tyr-haltigen Tripeptids im Inneren des gefalteten Proteins [338]. Somit sind außer der Gegenwart von Sauerstoff keine weiteren Substrate oder Kofaktoren notwendig und die Expression von GFP kann anhand seiner charakteristischen Grünfluoreszenz auch in unvorbehandelten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie leicht gemessen werden [40,57]. Solange es zu keinen Deletionen von mehr als sechs N- bzw. neun C-terminalen Aminosäuren kommt [75,195], wird die Fluoreszenz von GFP aufgrund seiner kompakten Faltung im allgemeinen nicht durch eine N- oder C-terminale Fusion mit einem zweiten Protein beeinträchtigt [213]. Um neben der Expression auch die Prozessierung und Antigenpräsentation *in vitro* untersuchen zu können, wurde als ein weiteres Modellantigen ein Bereich des Hühner-Ovalbuminproteins verwendet (OVA<sub>cyt</sub>) [284], welcher ein MHC-I-Epitop für eine spezifische murine CD8<sup>+</sup>-T-Zelllinie besitzt und dessen Präsentation im MHC-I-Kontext auch *in vitro* gemessen werden kann [108].

Die Auswahl der für die Experimente verwendeten Zelltypen orientierte sich zum einen an der Infektionsbiologie der Listeriose, und zum anderen an den immunologischen Grundlagen der Vakzinierung. Wie in Abschnitt 2.9.1 bereits beschrieben, stellen neben Hepatozyten auch Colonepithelzellen und vor allem phagozytische Zellen wie M $\Phi$  und DC im Menschen wie auch im Mausmodell wichtige Wirtszellen für *L. monocytogenes* dar [202,346]. Ferner sind M $\Phi$  als Effektorzellen sowie DC als Induktoren einer spezifischen Immunantwort für die Abwehr einer Infektion mit *L. monocytogenes* von zentraler Bedeutung [81,135,244,330,340]. Daher wurden zum einen Caco-2-Epithelzellen als Wirtszelle verwendet, die als eine permanente Zelllinie aus einem humanen Kolonadenokarzinom isoliert wurden [10,96,282] und bereits eine für das Studium zahlreicher Aspekte der Infektionsbiologie von *L. monocytogenes* etablierte Modellzelllinie darstellen (siehe z. B. [12,18,101,102]). Sie sind *in vitro* sehr leicht zu kultivieren und mit *L. monocytogenes* zu infizieren sowie einer Reihe experimenteller Manipulationen wie insbesondere der Mikroinjektion gut zugänglich [116]. Als Modellzellen für professionell phagozytische und antigenpräsentierende Zellen wurden P388.D1-M $\Phi$  [50,170] und FSDC [113,206] verwendet. Erstere sind ebenfalls als ein *in vitro*-Wirtszellmodell für *L. monocytogenes* etabliert [136,137,173,294] und besitzen neben ihrer

Befähigung zur Phagozytose eine Reihe von typischen Eigenschaften von Makrophagen wie z. B. die Stimulierbarkeit durch IFN- $\gamma$  [22,182,203,294], die Produktion von IL-1 nach Stimulation mit LPS oder die Synthese von Lysozym [170]. Die myeloide Zelllinie FSDC wurde aus der Haut von Mäuseföten isoliert und retroviral immortalisiert [113,206]. Ebenso wie frühe Vorläuferzellen unreifer DC sind sie zur konstitutiven Makropinozytose befähigt und können nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  sehr effizient Antigene an naive T-Zellen aus syngenen Mäusen präsentieren und somit ein T-Zell-Priming bewirken [113,206].

Da aufgrund ihrer Immortalisierung Zelllinien vom Phänotyp der entsprechenden primären Zelle mehr oder minder stark abweichen können [100], wurden zusätzlich auch primäre murine DC aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen [207] (BMDC) sowie primäre humane DC (hmoDC) verwendet, die über monozytäre Vorläuferzellen aus dem Blut von freiwilligen Spendern angezüchtet wurden [169].

## **2.12 Zielsetzung dieser Arbeit**

Da die zellwandverankerte Expression von heterologen Antigenen im Falle grampositiver Trägerbakterien bisher nur für extrazelluläre Bakterien wie z. B. *S. gordonii* etabliert wurde, war die Erzeugung auch einer effektiven CTL-Antwort gegen das heterologe Antigen nicht möglich [133]. Daher sollte ausgehend von einem in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  stabilisierten *balanced-lethal*-Plasmidsystem [255] ein System zur Expression von heterologen Antigenen in der Zellwand von *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  etabliert und charakterisiert werden.

Da ferner die Übertragung von Vakzinierungsplasmiden mittels *L. monocytogenes* *in vitro* in APC [140,255] wie auch *in vivo* ineffizient war [254,309] und teilweise nicht protektiv [314], sollte der Prozess der Baktinfektion mittels *L. monocytogenes* zellbiologisch genauer analysiert und darauf aufbauend diejenigen Schritte identifiziert werden, welche die Effizienz der Plasmidübertragung wesentlich begrenzen.

Darauf aufbauend sollten schließlich Wege aufgezeigt werden, um die Effizienz der Übertragung antigencodierender Plasmide auf APC zu steigern.

Schließlich können die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturversuche die Grundlage schaffen für den Einsatz von *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  als Träger von neuartigen Protein- und Nukleinsäurevakzinen in nachfolgenden Immunisierungsversuchen.

### 3. Material

Soweit möglich, sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Nukleinsäuren und Mikroorganismen bzw. Zellkulturen im Folgenden in tabellarischen Übersichten wiedergegeben.

#### 3.1 Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Durchflusszytometer	Epics Elite XL	Beckman Coulter
Elektroporationsgerät	MicroPulser	Bio-Rad
Elektroblot-Apparatur	-	Biotec-Fischer
Feinwaage	1 A 140P	Labor Alliance
Fluoreszenzmikroskop	DM R	Leica
Heizblock	-	Geb. Liebisch
Homogenisiergerät	FastPrep FP120	BIO101 Savant
Inverses Fluoreszenzmikroskop	DM IRB	Leica
Kammern für horizontale und vertikale Gelelektrophorese	-	Werkstatt des Biozentrums
Kühlzentrifugen	Megafuge 1.0R	Heraeus
	5417 R	Eppendorf
Laborradio	City Boy 1100	Grundig
Magnetrührer	Superior	Mariefeld
Mikroinjektionseinrichtung	Eppendorf Transjector 5246 mit Eppendorf Micromanipulator 5171	Eppendorf
Mikrowelle	-	Siemens
Netzgeräte	500/22	Desaga
	Power Pac 300	BioRad
PCR-Gerät	ProGene	Techne
pH-Meter	pH523	WTW
Photometer	900-3	Klett-Summerson
Real Time PCR-Gerät	PTC-200 DNA Engine™ Cyclor	MJ Research
	CFD-3200 Opticon™ Detector	MJ Research
Schüttelwasserbad	-	GFL
Sequenzierautomat	CEQ2000XL	Beckman Coulter
Speed-Vac	Concentrator 5301	Eppendorf
Spektralphotometer	Ultrospec III	Pharmacia Biotech
Sterile Werbank	NuAire II Type A/B3	Heraeus
	Lamin Air HBB2448	Flo Gelaire
Tischzentrifugen	Biofuge 15	Heraeus

Transmissionselektronenmikroskop	EM10	Zeiss
Ultraschallgerät	Sonifier B-12	Branson Sonic Power Company
UV-Leuchtkasten	-	Vilber Coumat
UV-Photometer	Gene Quant II	Bio-Rad
Vakuunkammer für Slot-Blot	Bio Dot®	Bio-Rad
Videoprinter	-	Mitsubishi
Vortexer	VortexGenie2	Scientific Industries,
Grobwaage	EW1500-2M	Kern & Sohn

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Sterile Einwegplastikware für die Zellkultur wurde von den Firmen Laborcenter, Brandt und Greiner bezogen, Mikroreaktionsgefäße (E-Cups) von der Firma Eppendorf (Hamburg).

### 3.3 Chemikalien

Standardlaborchemikalien und Antibiotika wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen, Enzyme wie Restriktionsendonukleasen, Polymerasen, Ligase und andere von den Firmen Pharmacia (Uppsala, Schweden), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Promega (Mannheim), Stratagene (La Jolla, USA) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

### 3.4 Stammlösungen der verwendeten Puffer

Puffer	pH	Zusammensetzung	
10 x MOPS	7,0	200 mM 50 mM 10 mM	MOPS NaOAc EDTA
10 x PBS	7,4	15 mM 27 mM 85 mM 1,37 M	2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 g KCl 12 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaCl
10 x TBS	7,6	0,2 M 1,37 M	Tris-HCl pH 7,6 NaCl
10 x TBE		0,9 M 0,9 M 25 mM	Tris Borsäure EDTA
10 x Tris-Glyzin		0,25 M 1,92 M 1 % (w/v)	Tris Glyzin SDS
20 x SSC	7,0	3 M 0,3 M	NaCl Na <sub>3</sub> Citrat x 2 H <sub>2</sub> O

### 3.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden in lyophilisierter Form von der Firma Sigma Genosys (Steinheim) bezogen.

Name	Sequenz
3' actA ( <i>NsiI</i> )	TCTTC <u>ATGCAT</u> <sub><i>NsiI</i></sub> AGGTGGTGGCG
3' OVA C-Terminus ( <i>NsiI</i> )	C'TTTCTT <u>ATGCAT</u> <sub><i>NsiI</i></sub> AAGGGGAAAC
5' actA ( <i>NsiI</i> )	ACGAAA <u>ATGCAT</u> <sub><i>NsiI</i></sub> GTG
5' OVA C-Terminus ( <i>NsiI</i> )	AAGCCA <u>ATGCAT</u> <sub><i>NsiI</i></sub> TCATCAATTCC
Act A-1 ( <i>Bam</i> HI)	GCTTGG <u>GATCC</u> <sub><i>Bam</i>HI</sub> AGTTGGGGTTAACTG
ActA-1 ( <i>XmaI</i> <i>Hind</i> III)	AAAA <u>CCCGGG</u> <sub><i>XmaI</i></sub> T <u>GAAGCTT</u> <sub><i>Hind</i>III</sub> GGGAAGCAGTTGGGGTTAACTG
ActA-2	TTATACTCCCTCCTCGTGATACGC
Act A-2 ( <i>NsiI</i> )	GCTATA <u>ATGCAT</u> <sub><i>NsiI</i></sub> CTGCAAATATTATGTCGG
Act A-3 ( <i>SacI</i> <i>NotI</i> )	AAAA <u>GAGCTC</u> <sub><i>SacI</i></sub> <u>GCGGCCGC</u> <sub><i>NotI</i></sub> TGAAGCTTGGGAAGCAGTTGGGGTTAACTG
EGFPcheck antisense	ACAACCATGGTGAGCAAGGG
EGFPcheck sense	TACTTGTACAGCTCGTCCAT
gfp(-) ( <i>NsiI</i> )	AAGA <u>ATGCAT</u> <sub><i>NsiI</i></sub> ATTTGTATAGTTCATCCATGCC
gfp(+) ( <i>NsiI</i> )	GGAG <u>ATGCAT</u> <sub><i>NsiI</i></sub> ATATGAGTAAAGGAGAAGAAC
gfp(-) ( <i>PstI</i> )	ATGCC <u>CTGCAG</u> <sub><i>PstI</i></sub> GTCTGGACATTTATTTG
gfp(+)	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGG
hly-1 ( <i>Bam</i> HI)	GATTAGTAG <u>GATCC</u> <sub><i>Bam</i>HI</sub> TATCTTAAAGTGAC
hly-2 ( <i>NsiI</i> )	GAATGCAG <u>ATGCAT</u> <sub><i>NsiI</i></sub> CCTTTGCG
inl A-1 ( <i>NsiI</i> )	GCGACGG <u>ATGCAT</u> <sub><i>NsiI</i></sub> TGCCAGCAAATG
inl A-2	CACACTATCCTCTCCTTGATTCTAG
inl A-Terminator ss(-)	<u>CCGGG</u> <sub><i>XmaI</i></sub> TTATTAAAAAATAAAAAAGCTAGATATAGTCCGAAAACCACATCT AGCTCTTTTACACTACTTCT <u>ATGCA</u> <sub><i>NsiI</i></sub>
inl A-Terminator ss(+)	<u>T</u> <sub><i>NsiI</i></sub> AGAAGTAGTGTAAGAGCTAGATGTGGTTTTTCGGACTATATCTAGCTTTT TTATTTTTTTAATAAC <u>C</u> <sub><i>XmaI</i></sub>
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
M13 universe	GTAAAACGACGGCCAGT
PoIT7-1 ( <i>NotI</i> <i>SacI</i> )	AAAA <u>GAGCTC</u> <sub><i>SacI</i></sub> <u>GCGGCCGC</u> <sub><i>NotI</i></sub> ATGAACACGATTAACATCGC
PoIT7-2 ( <i>XmaI</i> <i>PstI</i> )	TAATCCCGGTCTGCAGTTACGCGAACGCGAAGTCCG
PoIT7-3 ( <i>NotI</i> <i>PstI</i> )	AAAA <u>CTGCAG</u> <sub><i>PstI</i></sub> <u>GCGGCCGC</u> <sub><i>NotI</i></sub> TTACGCGAACGCGAAGTCCG
Poly (A)	<u>GGCCGC</u> <sub><i>NotI</i>A<sub>98</sub>C</sub>
Poly (T)	<u>GGCCG</u> <sub><i>NotI</i>T<sub>98</sub>GC</sub>
pSPxPcmvfor	GGCCGTAAACGCAGAAAATA
pSPxPcmvrev	TTCGCCTTCTCTGTCTGCTAT
SV40 72bp repeat(-)	<u>G</u> <sub><i>PstI</i></sub> GTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGC ATCTCAATTAGTCAGCAACC <u>ATGCA</u> <sub><i>PstI</i></sub>
SV40 72bp repeat(+)	<u>T</u> <sub><i>PstI</i></sub> GGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGCTG

T7 EPK anti-s	GGGAGCCTGGGGACTTTCCACAC <u>CTGCA</u> <sup>PstI</sup> TTTT <u>GAGCTC</u> <sup>SacI</sup> CGTAATACGACTCACTATAGG
T7-EPK anti-s 1	TTTT <u>GAGCTC</u> <sup>SacI</sup> CGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTG <u>CCCGGG</u> <sup>XmaI</sup> <u>CAC</u> <u>CGCGG</u> <sup>SacII</sup> TG <u>GCGGCCGC</u> <sup>NotI</sup> A
T7-EPK anti-s 2	AAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCT TGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT
T7 EPK s	ATCG <u>CTGCAG</u> <sup>PstI</sup> CGATCCGGATATAGTTCC
T7-EPK s-1	ATCG <u>CTGCAG</u> <sup>PstI</sup> CGATCCGGATATAGTTCCCTCCTTTCAGCAAAAAACCCCTCA AGACCCGTTTAGA
T7-EPK s-2	GGCAGCAGCCAACCTCAGCTTCCTTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCC <u>GGATCC</u> <sup>BamHI</sup> <u>A</u> <u>CTAGT</u> <sup>SpeI</sup> <u>ATGCAT</u> <sup>NsiI</sup> <u>GCG</u> <sup>SphI</sup> <u>GCCGC</u> <sup>NotI</sup> <u>CACCGCGG</u> <sup>SacII</sup> TG <u>CC</u> <sup>XmaI</sup>
T7RNAP seq1	GAAAGCTAAGCGCGGCAAGC
T7RNAPseq2	TCTAAGGGTCTACTCGGTGGCGAGG
T7RNAPseq3	CGCTGGTGCGTACTCACAGT
T7RNAPseq4	TATCAGCCTTGAGTTCATGC
T7RNAPseq5	CCACTGGAGAACAACCTTGGTG
T7RNAPseq6	CCGTGACCGATGAGAACAAC
T7RNAPseq7	GAAGTGGCTTAAGTCTGCTG
T7RNAPseq8	TGGGCACACGAGAAGTACGG
trpScheckfor	GACGAACATGCTATTACGGTT

### 3.6 Plasmide

Sämtliche für diese Promotion verwendeten oder im Rahmen dieser Promotion hergestellten Plasmide zur Verwendung in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  basieren auf den Plasmiden pSP0 [255] und pFLO1 [71] und sind zur besseren Übersicht in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Name	Relevante Eigenschaften	Herkunft	Referenz
Ausgangsplasmide			
pBacMam-2	<i>oriE1, ap, orif1, lef-2</i> , P <sub>CAG</sub> -T <sub><math>\beta</math></sub> -globin	Novagen	[303]
pCI-OVA	<i>oriE1, ap, ova</i>	J. Fensterle	
pDsRed-1	<i>oriE1, ori SV40</i> , P <sub>SV40</sub> - <i>km</i> -polyA <sub>HSV TK</sub> , P <sub>CMV IE</sub> - <i>rfp</i> -polyA <sub>SV40</sub> , <i>orif1</i>	Clontech	Clontech
pEGFP-1	<i>oriE1, ori SV40</i> , P <sub>SV40</sub> - <i>km</i> -polyA <sub>HSV TK</sub> , P <sub>CMV IE</sub> - <i>egfp</i> - polyA <sub>SV40</sub> , <i>orif1</i>	Clontech	Clontech
pFLO1	<i>oriE1, repU, tc</i>	S. Pilgrim	
pIRES2-EGFP	<i>oriE1, ori SV40</i> , P <sub>SV40</sub> - <i>km</i> - polyA <sub>HSV TK</sub> , P <sub>CMV IE</sub> -IRES <sub>ECMV</sub> - <i>egfp</i> -polyA <sub>SV40</sub> , <i>orif1</i>	Clontech	Clontech
pKEN	<i>oriE1, ap, gfp</i>	S. Falkow	[57]
pLSV16-P <sub>actA</sub> - <i>gfp</i>	<i>oriE1, ori</i> pLSV16, P <sub>actA</sub> - <i>gfp</i>	M. Goetz	[72]
pMK4	<i>oriE1, ori</i> pCI194, <i>ap, cmr, lacZ</i>	J. Kreft	[322]
pUC18	<i>oriE1, ap, lacZ</i>	Stratagene	[371]
pUNK1	<i>oriE1, repD, repE, ent</i>	S. Pilgrim	[255]
Derivate von pBacMam-2			
pBacMam-EGFP	P <sub>CAG</sub> - <i>egfp</i> -T <sub><math>\beta</math></sub> -globin		diese Arbeit
Derivate von pFLO1			
pCSB0	P <sub>T7</sub> -T <sub>T7</sub>		diese Arbeit
pCSB1	P <sub>T7</sub> -IRES <sub>EMCV</sub> - <i>egfp</i> -T <sub>T7</sub>		diese Arbeit
pCSB2	IRES <sub>EMCV</sub> - <i>egfp</i>		diese Arbeit
pCSB3	P <sub>T7</sub> - <i>egfp</i> -T <sub>T7</sub>		diese Arbeit
pCSB4	P <sub>T7</sub> -SD- <i>gfp</i> -T <sub>T7</sub>	B. Bergmann	diese Arbeit
pCSB5	P <sub>T7</sub> -IRES <sub>EMCV</sub> - <i>egfp</i> -(A) <sub>98</sub> -T <sub>T7</sub>		diese Arbeit
pCSB6	P <sub>CMV</sub> -IRES <sub>EMCV</sub> - <i>egfp</i>		diese Arbeit
pCSB7	P <sub>T7</sub> -IRES <sub>EMCV</sub> - <i>ovd<sub>cyt</sub></i> -T <sub>T7</sub>		diese Arbeit
pCSB8	P <sub>actA</sub> - <i>polT7</i>	B. Bergmann	diese Arbeit
pTRPS	P <sub>trpS</sub> - <i>trpS</i> -T <sub>trpS</sub>	S. Pilgrim	[255]
Derivate von pMK4			
pMK4- <i>trpS</i>	<i>oriE1, ori</i> pCI194, <i>ap, cmr, lacZ</i> , P <sub>trpS</sub> - <i>trpS</i> -T <sub>trpS</sub>	S. Pilgrim	-

Derivate von pUNK1			
pSP0	$P_{trpS-trpS-T_{trpS}}$	S. Pilgrim	[255]
pSP118	$P_{trpS-trpS-T_{trpS}}, P_{actA-ply118}$	S. Pilgrim	[255]
Derivate von pSP0			
	$P_{actA-gfp}$		diese Arbeit
	$P_{T7-T7}$		diese Arbeit
pAGA	$(PS)_{actA-gfp-A_{inlA}}$		diese Arbeit
pAOA	$(PS)_{actA-ova-A_{inlA}}$		diese Arbeit
pAOT	$(PS)_{actA-ova-T_{inlA}}$		diese Arbeit
pCSA0	$P_{actA-polT7}$	B. Bergmann	diese Arbeit
pCSA5	$P_{T7-SD-gfp-T7}$	B. Bergmann	diese Arbeit
pHAA	$(PS)_{hly-actA-A_{inlA}}$	B. Kimmel	diese Arbeit
pHGA	$(PS)_{hly-gfp-A_{inlA}}$		diese Arbeit
pHOA	$(PS)_{hly-ova-A_{inlA}}$		diese Arbeit
pHOT	$(PS)_{hly-ova-T_{inlA}}$		diese Arbeit
pSP0-EGFP	$P_{CMV-egfp}$	S. Pilgrim	
Derivate von pSP118			
pCAG-EGFP	$P_{CAG-egfp-T_{\beta\text{-globin}}}$		diese Arbeit
pCSA1	$P_{actA-polT7}$		diese Arbeit
pCSA2	$polT7$		diese Arbeit
pCSA3	$P_{actA-IRES_{EMCV}-egfp}$		diese Arbeit
pCSA4	$P_{actA-gfp}$		diese Arbeit
pSP118-CytOva	$P_{CMV-SD/SA_{SV40}-ova_{cyt}-polyA_{SV40}}$	D. Löffler	-
pSP118-eEGFP	$ENH_{A_{SV40}}-P_{CMV-SD/SA_{SV40}-egfp-polyA_{SV40}}$		diese Arbeit
pSP118-EGFP	$P_{CMV-SD/SA_{SV40}-egfp-polyA_{SV40}}$	S. Pilgrim	[255]
pSP118- $P_{CMV}$	$P_{CMV-SD/SA_{SV40}-polyA_{SV40}}$	S. Pilgrim	
Derivate von pUC18			
pUC- $A_{inlA}$	$A_{inlA}$	B. Kimmel	diese Arbeit
pUC- $T_{inlA}$	$T_{inlA}$		diese Arbeit
pUC-(PS) $_{actA}$	$(PS)_{actA}$	B. Kimmel	diese Arbeit
pUC-(PS) $_{actA-A_{inlA}}$	$(PS)_{actA-A_{inlA}}$	B. Kimmel	diese Arbeit
pUC-(PS) $_{actA-T_{inlA}}$	$(PS)_{actA-T_{inlA}}$		diese Arbeit
pUC-(PS) $_{hly}$	$(PS)_{hly}$	B. Kimmel	diese Arbeit
pUC-(PS) $_{hly-A_{inlA}}$	$(PS)_{hly-A_{inlA}}$	B. Kimmel	diese Arbeit
pUC-(PS) $_{hly-T_{inlA}}$	$(PS)_{hly-T_{inlA}}$		diese Arbeit
pUC-AGA	$(PS)_{actA-gfp-A_{inlA}}$		diese Arbeit
pUC-AOA	$(PS)_{actA-ova-A_{inlA}}$		diese Arbeit
pUC-AOT	$(PS)_{actA-ova-T_{inlA}}$		diese Arbeit
pUC-HGA	$(PS)_{hly-gfp-A_{inlA}}$		diese Arbeit

pUC-HOA	(PS) <sub>hly-Ova-A<sub>intA</sub></sub>	diese Arbeit
pUC-HOT	(PS) <sub>hly-Ova-T<sub>intA</sub></sub>	diese Arbeit

Das Plasmid pSP0 [255] (Abbildung 3.1 A) besitzt als Shuttleplasmid für die Klonierung in grampositiven wie gramnegativen Bakterien neben einem gramnegativen Replikationsursprung aus Plasmid pUC18 (*oriE1*) auch einen grampositiven Replikationsursprung aus Plasmid pAMβ1 (*repD*, *repE*). Ferner codiert es für eine Erythromycinresistenz (*em<sup>r</sup>*) und enthält als sogenanntes *balanced-lethal*-Plasmid das *trpS*-Gen. Plasmid pSP118 [254] enthält zusätzlich noch *ply118* unter der Kontrolle des listeriellen *actA*-Promotors [72] und Plasmid pSP118-EGFP (Abbildung 3.1 B) das Gen für das *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) unter der Kontrolle des CMV-Promotors [255]. Die Derivate des Shuttleplasmids pFLO1 (Abbildung 3.1 C) enthalten wie dieses den grampositiven Replikationsursprung aus Plasmid pBC16 (*repU*) [19], den gramnegativen Replikationsursprung aus pUC18 (*oriE1*) sowie ein Tetracyclinresistenzgen (*tc<sup>r</sup>*). Plasmid pTRPS enthält wie pSP0 noch das *trpS*-Gen und ist somit im Gegensatz zu Plasmid pFLO1 gegen Verlust in *L. monocytogenes* Δ*trpS* stabilisiert [255].

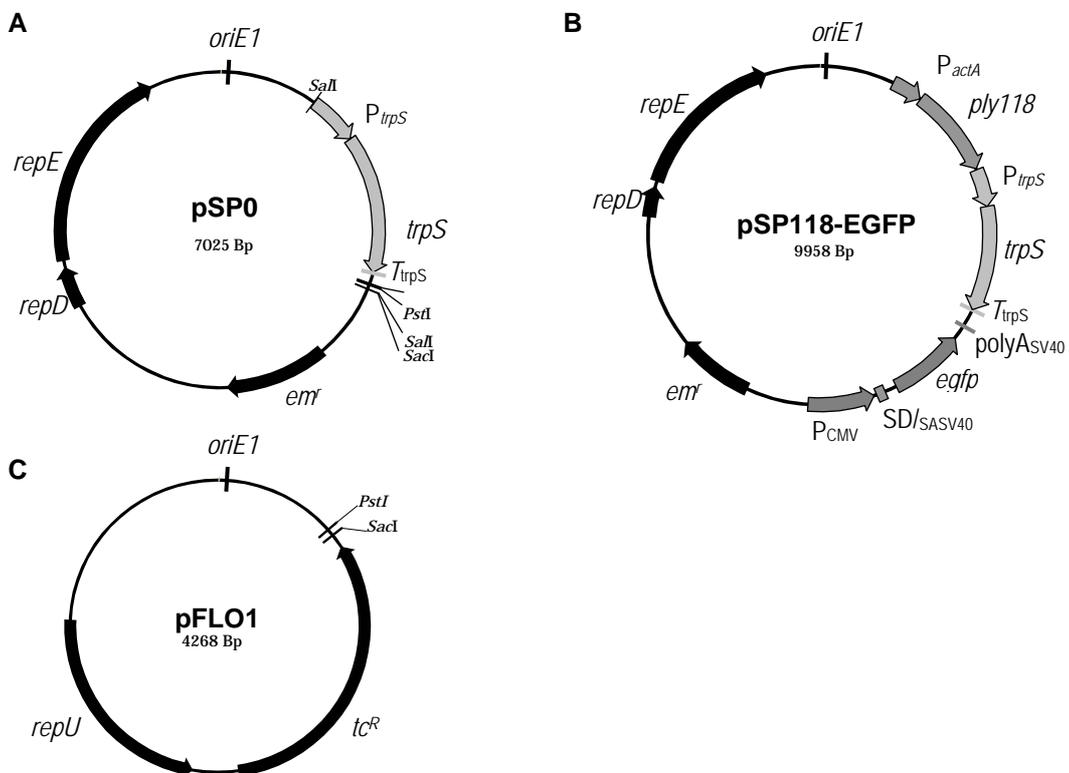


Abbildung 3.1: In dieser Arbeit verwendete Ausgangsvektoren. Für Details siehe Text.

### 3.7 Bakteriologische Nährmedien

Medium	Zusammensetzung		Hersteller
BHI	37 g	BHI mit deion. H <sub>2</sub> O ad 1,0 l	Difco, Detroit (USA)
LB	16,0 g 5,0 g 10,0 g	Caseinhydrolysat Yeast-Extract NaCl mit deion. H <sub>2</sub> O ad 1,0 l	Oxoid, Wesel Becton Dickinson, Le Pont de Claix (F) Carl Roth GmbH, Karlsruhe
LSA	27,8 g	Listeria Selektiv Agar mit deion. H <sub>2</sub> O ad 0,5 l	Oxoid (Kat. Nr. CM856), Wesel
3,5 x SMHEM	952 mM 3,5 mM 7 mM	Sucrose MgCl <sub>2</sub> HEPES pH 7,2 mit deion. H <sub>2</sub> O ad 1,0 l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe Merck, Darmstadt Sigma, Steinheim
TB	12 g 24 g 3 ml 2,31 g 12,54 g	Caseinhydrolysat Yeast-Extract Glycerol KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Oxoid, Wesel Becton Dickinson, Le Pont de Claix (F) Merck Merck Merck
2 x YT	16,0 g 10,0 g 10,0 g	Caseinhydrolysat Yeast-Extract NaCl mit deion. H <sub>2</sub> O ad 1,0 l	Oxoid, Wesel Becton Dickinson, Le Pont de Claix (F) Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Falls erforderlich, wurde zur Herstellung von festen Nährmedien den Flüssigmedien vor dem Autoklavieren jeweils 15 g/l Agar zugesetzt.

### 3.8 Antibiotikazusätze

Soweit erforderlich, wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C folgende Antibiotika zugesetzt.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	
		<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml	-
Chloramphenicol	30 mg/ml in 100% Ethanol	30 µg/ml	10 µg/ml
Erythromycin	100 mg/ml in 100% Ethanol	600 µg/ml	5 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml	-
Penicillin G	5 mg/ml in H <sub>2</sub> O	-	5 µg/ml
Tetracyclin	20 mg/ml in 50% Ethanol	20 µg/ml	5 µg/ml

### 3.9 Sonstige Medienzusätze

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
IPTG	100 mM in H <sub>2</sub> O	-
X-Gal	2% in Dimethylformamid	-
Cellobiose	-	50 mM

### 3.10 Bakterienstämme

Name/Abkürzung	Charakterisierung	Herkunft	Referenz
Ausgangsstämme			
<i>E. coli</i> DH10b	F <sup>'</sup> , <i>mcrA</i> Δ-( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), φ80d/ <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX</i> 174, <i>deoR</i> , <i>recA</i> 1, φ <i>araD</i> 139 Δ( <i>ara, leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i>	Invitrogen	[132]
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE</i> 44, <i>hsdR</i> 17, <i>recA</i> 1, <i>relA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>gyrA</i> 96, <i>thi</i> -1	Invitrogen	[132]
<i>L. monocytogenes</i>	Δ <i>actA</i>	Institutssammlung	
<i>L. monocytogenes</i> EGD	Wildtypisolat	Institutssammlung	
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e Sv1/2	Wildtypisolat	Institutssammlung	[114]
<i>L. monocytogenes</i> OVA	P <sub><i>hly-ova</i></sub>	G. Geginat	[300]
<i>L. monocytogenes</i> WL-140	Δ <i>trpS</i> , pTRPS	S. Pilgrim	[255]
<i>L. monocytogenes</i> WL-141	Δ <i>trpS</i> Δ <i>araA</i> , pTRPS	J. Stritzker	[255]
<i>L. monocytogenes</i> WL-142	Δ <i>trpS</i> Δ <i>actA</i> , pTRPS	S. Pilgrim	[255]
<i>S. typhimurium</i> SL7207	<i>aroA</i>	B.A.D. Stocker	[144]
Derivate von <i>L. monocytogenes</i> EGD			
GD	pLSV16- <i>PactA-gfp</i>	Institutssammlung	[72]
Derivate von <i>L. monocytogenes</i> WL-140			
A27	pAGA		diese Arbeit
A28	pAOA		diese Arbeit
A29	pHGA		diese Arbeit
A30	pHOA		diese Arbeit
A31	pSP0		S. Pilgrim
A54	pAOT		diese Arbeit
A56	pHOT		diese Arbeit
D0	pSP118-P <sub>CMV</sub>		S. Pilgrim

D1	pSP118-eEGFP		diese Arbeit
D2	pCAG-EGFP		diese Arbeit
S0	pSP0-EGFP		[255]
S1	pSP118-EGFP		[255]
S5	pCSA5	B. Bergmann	diese Arbeit
S6	pCSA0	B. Bergmann	diese Arbeit
S8	pCSA5 + pCSB8	B. Bergmann	diese Arbeit
S9	pCSA0 + pCSB4	B. Bergmann	diese Arbeit
S12	pCSA1		diese Arbeit
S13	pCSA0 + pFLO1		diese Arbeit
S15	pCSA1 + pCSB1		diese Arbeit
S17	pCSA1 + pCSB4		diese Arbeit
S19	pCSA0 + pCSB1		diese Arbeit
S21	pSP118		S. Pilgrim
S22	pSP118 + pCSB1		diese Arbeit
S23	pCSA1 + pCSB2		diese Arbeit
S25	pCSA1 + pCSB3		diese Arbeit
S29	pCSA2		diese Arbeit
S31	pCSA2 + pCSB1		diese Arbeit
S33	pCSA2 + pCSB4		diese Arbeit
S37	pSP118 + pCSB6		diese Arbeit
S52	pCSA4		diese Arbeit
S57	pCSA3		diese Arbeit
S62N	pCSA1+ pCSB7		diese Arbeit
S63	pCSA1+ pCSB5		diese Arbeit
Derivate von <i>L. monocytogenes</i> WL-141			
S72	pSP118-EGFP	J. Stritzker	[255]
Derivate von <i>L. monocytogenes</i> WL-142			
BK	pHAA		B. Kimmel
S54	pCSA4		diese Arbeit
S65	pCSA1		diese Arbeit
S67	pCSA1 + pCSB4		diese Arbeit
S68	pCSA1 + pCSB1		diese Arbeit
S70	pSP118-EGFP		[255]
S71	pSP0-EGFP		[255]
Derivate von <i>S. typhimurium</i> SL7207			
ST1	pSP118-EGFP		diese Arbeit

### 3.11 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Name	Bemerkung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (MEM)	D-phosphatfreies Medium für Transfektionen	Invitrogen™, Karlsruhe
Fötales Kälberserum	Komplementinaktivierung über 30 min bei 56 °C	Invitrogen™, Karlsruhe
RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin	Standardmedium für Zellkultur	Invitrogen™, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Passagieren adhärenter Zellen	Invitrogen™, Karlsruhe

### 3.12 Zelllinien

Name	Kurzbeschreibung	Bezugsquelle	Referenz
Caco-2	humane, epitheliale Adenocarcinomzellen	ECACC*	[96]
COS-1	Affennierenzellen	Institutssammlung	[115]
FSDC	murine dendritische Zellen aus fetaler Haut	H. Moll	[113]
J774.A1	murine BALB/c Monozyten-/Makrophagenzelllinie	ECACC	[272]
P388.D1	murine lymphoide Makrophagen	ECACC	[170]

### 3.13 Spezialchemikalien für zellbiologische Versuche

Name	Stammlösung	Endkonzentration	Bezugsquelle
$\alpha$ -Amanitin	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ g/ml	Sigma
7-Aminoactinomycin-D (7-AAD)	1 mg/ml in DMSO	2 $\mu$ g/ml	Sigma
Cycloheximid	10 mg/ml in DMSO	50 $\mu$ g/ml	Sigma
Dextran (70kD)-Texas Red	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	Molecular Probes
Propidiumiodid	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ g/ml	Sigma
Rifampicin	15 mg/ml in abs. Ethanol	15 $\mu$ g/ml	Sigma
rm GM-CSF	200 U/ $\mu$ l in H <sub>2</sub> O	200 U/ml	Strathmann
rm Interferon- $\gamma$	10 <sup>6</sup> U/ml in H <sub>2</sub> O	10 <sup>2</sup> U/ml	Strathmann
Streptavidin-CyChrome	-	1:100	Sigma
Thymidin	-	7,5 mM	Sigma
Trypanblau-Stammlösung	0,4%	0,02%	Sigma

### 3.14 Antikörper für Elektronenmikroskopie (EM), Fluoreszenzmikroskopie (FM) und Immunoblots (IB)

Antikörper Spezifität	Anwendung	Kopplung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
$\alpha$ -ActA-pAk	FM	-	Kaninchen	1:50	M. Kuhn
$\alpha$ -GFP-pAk	FM, IB	-	Kaninchen	1:500 (FM), 1:5000 (IB)	Invitrogen
$\alpha$ -Internalin A	IB	-	Kaninchen	1:2000	M. Kuhn
$\alpha$ -Kaninchen	EM	12 nm Gold	Maus	1:10	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Kaninchen	FM	Rhodamine Red™	Ziege	1:100	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Kaninchen	IB	Peroxidase	Ziege	1:5000	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -Maus	IB	Peroxidase	Ziege	1:5000	Dianova, Hamburg
$\alpha$ -OVA-pAk	IB	-	Kaninchen	1:5000	Sigma
$\alpha$ -PolT7-mAk	IB	-	Maus IgG1	1:5000	Oncogene

### 3.15 Verwendete Software

Programm	Verwendung	Hersteller
Excel 2000	Tabellenkalkulation und Statistik	Microsoft
SystemII	Datenaufnahme mit Durchflusszytometer	Beckman Coulter
METAMORPH imaging software	Bildaufnahme mit Fluoreszenzmikroskop	Universal Imaging
VectorNT16.0	Plasmidkonstruktion, DNA-Sequenzanalyse	Inforomax
Photoshop7.0	Bildverarbeitung	Adobe
WinMDI2.8	Durchflusszytometrie Datenanalyse	J. Trotter

## 4. Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA

#### 4.1.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *L. monocytogenes*

Ein Milliliter einer Übernachtskultur (ÜNK) wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (E-Cup) überführt und in einer Tischzentrifuge über 2–5 min abzentrifugiert. Das Pellet wird einmal mit 1 ml TNE (10 mM Tris pH 8,0, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA) gewaschen und anschließend in 270 µl TNE (TNE-Puffer mit 1% Triton X-100) resuspendiert. Dann werden 30 µl Lysozym-Stammlösung (100 mg/ml in H<sub>2</sub>O) sowie 1 µl RNase-Stammlösung (25 mg/ml in H<sub>2</sub>O) zugesetzt und der Ansatz über 60 min bei 37°C inkubiert bzw. solange, bis die anfangs trübe Suspension sich etwas aufklart. Dann werden 25 µl Proteinase K-Stammlösung (20 mg/ml in H<sub>2</sub>O) zugeben und weitere 60 min bei 55°C inkubiert (Lösung muß vollständig klar sein). Anschließend werden 200 µl Guanidin-Lösung (6 M GuSCN, 20 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 6,5, 40 g/l Triton X-100, 10 g/l DTT) zugeben und 5 min bei RT inkubiert. Zur Aufreinigung der DNA wird 1 ml BIND-Mix (Suspension von 4 g Silicagel (Aldrich #28,851-9) in 100 ml Guanidin-Lösung) zugeben und 3 min bei RT inkubiert. Die Silicagel-Matrix wird durch kurze Zentrifugation (3 Sek. bei 5000 x g) pelletiert und das Pellet anschließend in 1 ml Guanidin-Lösung resuspendiert und erneut pelletieren. Das Pellet wird ein zweites Mal in 1 ml Guanidin-Lösung resuspendiert und anschließend pelletiert sowie danach zweimal mit Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 25% Ethanol, 25% Isopropanol) gewaschen. Das DNA-haltige Pellet wird noch einmal mit reinem Ethanol gewaschen und in der SpeedVac 3 min getrocknet. Die getrocknete Silicagel-Matrix wird dann in 100 µl 10 mM Tris pH 8,0 resuspendiert und die chromosomale DNA mittels 3 minütiger Inkubation bei 65°C in Lösung gebracht. Nach kurzer Zentrifugation wird der DNA-haltige Überstand abgenommen und bei 4°C gelagert.

#### 4.1.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Mini-Maßstab (Miniprep)

Die Isolation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab erfolgte jeweils aus 2 ml ÜNK von *E. coli* in 2 x YT-Medium mittels des „GFX™ Micro Plasmid Prep Kit“ von Amersham Biosciences (Freiberg, Deutschland) exakt nach Herstellerangaben. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 ad 0,1–0,2 µg/µl Endkonzentration gelöst und bei -20°C gelagert.

#### 4.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im Midi-Maßstab (Midiprep)

Die Herstellung größerer Mengen hochreiner DNA erfolgte jeweils aus 20 ml ÜNK von *E. coli* in 2 x YT-Medium mittels des „NucleoBond® PC100 Kit“ von Machery-Nagel (Düren, Deutschland). Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 ad 0,5-1,0 µg/µl Endkonzentration gelöst und bei -20°C gelagert.

#### 4.1.4 Schnelllysat von Bakterienkolonien für PCR

Mit einer an der Spitze zugeschmolzenen gelben Pipettenspitze wird eine Bakterienkolonie von der Platte abgekratzt und in 50 µl vorgelegtem MQ-H<sub>2</sub>O solange resuspendiert, bis die Lösung deutlich trübe ist. Alternativ werden 50 µl einer Übernachtskultur abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl MQ-H<sub>2</sub>O

resuspendiert. Die Suspension wird für ca. 5 min (*E. coli*) bzw. 10 min (*L. monocytogenes*) bei 110°C in Heizblock inkubiert und anschließend sofort auf Eis 2-5min gekühlt. Nach Zentrifugation über 5 min bei 14000 rpm und RT in einer Tischzentrifuge werden die Lysate sofort wieder auf Eis gekühlt und 5 µl pro 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

#### 4.1.5 Restriktionsverdau von Plasmid- und genomischer DNA

Die Restriktionsenzyme samt zugehöriger Puffer wurden von den Firmen New England BioLabs, MBI Fermentas bzw. Stratagene bezogen. Für analytische Zwecke wurden 0,5-1,0 µg Plasmid-DNA über 1-3 h in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 10-20 U Enzym im jeweils zugehörigen Puffer bei der jeweils optimalen Temperatur verdaut. Ein präparativer Verdau von 2-5 µg Plasmid-DNA erfolgte in 50 µl Reaktionsvolumen mit 20-50 U Enzym im zugehörigen Puffer über Nacht bei der jeweils optimalen Temperatur. Für einen Verdau von bereits linearisierter Plasmid-DNA wurde die Inkubationszeit auf 3 h herabgesetzt.

#### 4.1.6 Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation von bestimmten Abschnitte aus genomischer oder von Plasmid-DNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte routinemäßig in einem 50 µl-Reaktionsansatz gemäß folgendem Pipettierschema:

MQ-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl
10 x PCR-Puffer (2,5 mM Mg <sup>2+</sup> )	5,0 µl
dNTP-Mix (20 mM je Nukleotid)	0,5 µl
Primer 1 (0,5 µg/µl)	0,5 µl
Primer 2 (0,5 µg/µl)	0,5 µl
DNA-Polymerase:	
Taq	0,5 µl
Pfu	1,0 µl
Template :	
Bakterienschnelllysate	5 µl
genomische DNA (10 ng/µl)	50 ng
Plasmid-DNA (1 ng/µl)	5 ng

Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe des „ProGene“ PCR-Geräts der Firma Techne nach folgendem Programm:

1.	1 Zyklus	95°C	2 min
2.	30 Zyklen	95°C	1 min
		T <sub>a</sub>	1 min
		72°C	t <sub>e</sub>
3.	1 Zyklus	72°C	5 min
		4°C	∞

Ausgehend vom AT- und GC-Gehalt der Primer  $i \in \{1;2\}$  wurde dafür die Annealingtemperatur T<sub>a</sub> aus den Schmelztemperaturen T<sub>m</sub> der beiden Primer wie folgt abgeschätzt:

$$T_a = \frac{1}{2} (T_{m,1} + T_{m,2}) - 5^\circ\text{C} \text{ mit } T_{m,i} \approx 4^\circ\text{C} \times [\text{GC}]_i + 2^\circ\text{C} \times [\text{AT}]_i$$

Die Extensionszeiten  $t_e$  betragen 1 min/1000 Bp für die Taq- und PfuTurbo-DNA-Polymerasen bzw. 3 min/1000 Bp für die Pfu-DNA-Polymerase.

#### 4.1.7 Rekombinante PCR

Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente mittels rekombinanter PCR oder SOE-PCR erfolgte in Anlehnung an Horton *et al.* [145]. Das vereinfachte Schema ist Abbildung 4.1 gezeigt. Dazu werden zuerst in zwei separaten PCR die beiden zu verbindenden Ausgangsfragmente A und B mit Hilfe der Primerpaare {1;2} und {3;4} amplifiziert. Dabei überlappen sich die beiden internen Primer 2 und 3 in einem Bereich von 20-25 Bp. Diese Überlappung erlaubt in einer daran anschließenden PCR die Amplifikation des fusionierten Gens mittels der beiden äußeren Primer 1 und 4.

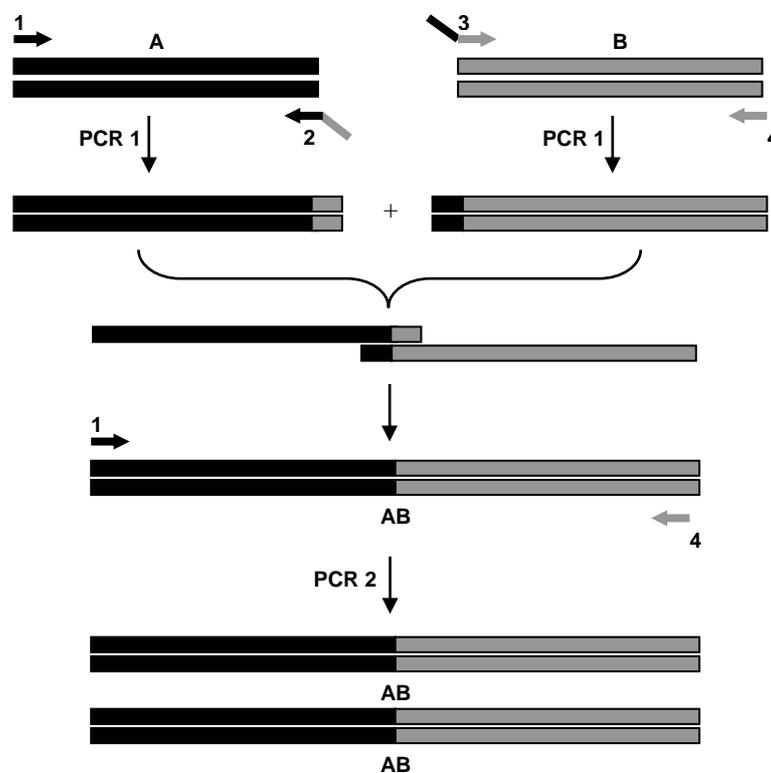


Abbildung 4.1: Prinzip der rekombinanten PCR. Für Details siehe Text.

Der Reaktionsansatz war mit dem einer Standard-PCR identisch, in der zweiten PCR diente ein äquimolares Gemisch der beiden, über Gelextraktion aufgereinigten Fragmente A und B als Template. Bei gleich langen Fragmenten wurden je ca. 100 ng eines jeden Fragments eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe der Pfu-Polymerase nach folgendem Programm:

- |    |           |      |       |              |
|----|-----------|------|-------|--------------|
| 1. | 1 Zyklus  | 95°C | 2 min |              |
| 2. | 4 Zyklen  | 95°C | 1 min |              |
|    |           | 45°C | 1 min | ramp 1°C/min |
|    |           | 72°C | $t_e$ |              |
| 2. | 30 Zyklen | 94°C | 1 min |              |

		$T_a$	1 min
		72°C	$t_e$
3.	1 Zyklus	72°C	5 min
		4°C	$\infty$

Die Berechnung von  $T_a$  richtete sich dabei nach den Schmelztemperaturen der beiden äußeren Primer.

#### 4.1.8 Quantifizierung von DNA mittels *Real-Time-PCR*

Die Bestimmung der Kopienzahl der Plasmide pTRPS, pMK4-TRPS und pSP0 in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  erfolgte über die Bestimmung der Anzahl der *trpS*-Genkopien pro Bakterienzelle mittels Real Time-PCR unter Verwendung der Primer *trpSseq3* und *trpScheckfor* sowie des „qPCR™ Mastermix Plus for SYBR® Green I“ (Eurogentec, Seraing, Belgien) in einem „PTC-200 DNA Engine™“-PCR-Gerät mit „CFD-3200 Opticon™“-Detektor (MJ Research, Boston, USA) jeweils nach Herstellerangaben. Zur Kalibrierung diente eine Verdünnungsreihe des Plasmids pSP0 bekannter Konzentration. Ferner wurde dazu 1 ml einer spätlogarithmischen Population (180 Klett) geerntet, einmal mit MQ-H<sub>2</sub>O gewaschen und die Lebendkeimzahl (VBC) ermittelt. Die Zellen wurden anschließend durch dreimaliges Schreddern über je 45 s auf Stufe 6,5 bei 4°C in einem „FastPrep FP120“-Homogenisator (BIO101 Savant) lysiert und anschließend erneut die VBC ermittelt, wodurch eine annähernd quantitative Lyse der Bakterien bestätigt werden konnte. Pro 25 µl-Ansatz wurden je 0,25 µl Primer, 12,5 µl „qPCR™ Mastermix Plus for SYBR® Green I“ und 2 µl Plasmid bzw. Bakterienlysat verwendet.

#### 4.1.9 Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen

Die Abtrennung doppelsträngiger DNA > 100 Bp nach PCR von verunreinigenden Primermolekülen, Nukleotiden, Proteinen und niedermolekularen Verunreinigungen erfolgte mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Aufreinigung von einzelsträngigen DNA-Molekülen > 17 Bp sowie von doppelsträngigen DNA-Molekülen > 40 Bp nach enzymatischen Reaktionen erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen) ebenfalls nach Anleitung des Herstellers.

#### 4.1.10 Elektrophoretische Trennung von DNA in nativen Agarosegelen

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten einer Länge zwischen 0,1 kB und 10,0 kB in nativen Agarosegelen wurde der aufzutrennende Ansatz mit einem fünftel Volumen 5 x Auftragspuffer (40% (w/v) Saccharose, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,5% (w/v) SDS, 0,1 M EDTA pH 8,0) versetzt. Die Auftrennung erfolgte in 0,6 - 3,0%igen (w/v) Agarosegelen in TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat pH 8,3, 2,5 mM EDTA) bei einem Spannungsgradienten von 5 - 10 V/cm.

Je nach aufzutrennenden Fragmentlängen wurden folgende Agarosekonzentrationen verwendet:

Trennbereich	Agarosekonzentration (w/v)
1-12 kB	0,7 %
0,5-7 kB	1 %
0,2-3 kB	2 %
70 Bp-1kB	3 %

Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente mittels UV-Transillumination wurde das Gel anschließend für 15-20 min in ein Ethidiumbromidfärbebad (1 µg/ml in TBE-Puffer) gegeben und dann auf einem UV-Leuchtkasten gelegt und fotografiert.

#### 4.1.11 Elektrophoretische Trennung von DNA in nativen Polyacrylamidgelen

Die Auftrennung von kürzeren DNA-Fragmenten erfolgte mittels Elektrophorese in vertikalen Polyacrylamidgelen. Für 1,5 mm dicke Gele der Abmessung 13 cm x 10 cm (b x h) wurden in einem 50 ml-Greineröhrchen folgender Ansatz angesetzt:

dest. H <sub>2</sub> O	ad 25 ml
10 x TBE	2,5 ml
30 % Acrylamidlösung	x ml
10 % APS	200 µl
TEMED	20 µl

Je nach aufzutrennenden Fragmentlängen wurden folgende Acrylamidkonzentrationen verwendet:

Trennbereich (Bp)	Gelkonzentration [% (w/v)]	Acrylamidlösung (ml)
1000-2000	3,5	2,9
100-1000	5,0	4,2
60-400	8,0	6,7
40-200	12,0	10,1
5-100	20,0	16,8

Die Mischung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch 1,5 mm dicke, mit Vaseline eingeriebene Plastikspacer voneinander getrennt waren und zur Formung von Probenaschen wurde unmittelbar anschließend ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. War das Gel auspolymerisiert, wurde der Kamm entfernt und die Proben mit einem fünftel Volumen 5 x Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und fotografiert.

#### 4.1.12 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten > 70 Bp aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) exakt nach Herstellerangaben.

#### 4.1.13 Extraktion von DNA aus Polyacrylamidgelen

Zur Extraktion von kleineren DNA-Molekülen aus Polyacrylamidgelen wurden die interessierenden Banden unter UV-Beleuchtung mittels einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, zerkleinert und über Nacht in einem 15 ml-Greinereröhrchen bei 37°C unter Schütteln in 3 ml Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 300 mM NaOAc, 0,2% SDS) inkubiert. Der Überstand wurde danach mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1 (v/v)) extrahiert und die DNA aus der wässrigen Oberphase schließlich mit 1/10 Vol. NaOAc pH 7,0 und 2,5 Vol. 96 %igen EtOH über Nacht bei -20°C ausgefällt. Das Pellet wurde nach Zentrifugation noch zweimal mit -20°C kaltem 70 %igen EtOH gewaschen, getrocknet und die DNA in 30 ml 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst.

#### 4.1.14 Phosphorylierung von DNA-Enden

Die Phosphorylierung von 5'-Enden von PCR-Fragmenten nach Amplifikation mit Pfu-Polymerase oder von ss-Oligonukleotiden erfolgte mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase. PCR-Fragmente wurden zuvor entweder über Gelextraktion oder direkt mittels „QIAQuick PCR Purification Kit“ und den darin enthaltenen Spin-Minisäulen aufgereinigt und in 30 µl MQ-H<sub>2</sub>O eluiert. Die Phosphorylierung von PCR-Fragmenten und dsDNA > 100 Bp erfolgte mit folgendem Ansatz:

MQ-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl
10 x T4 Polynukleotidkinase-Puffer	5 µl
10 x ATP (10 mM)	5 µl

Substrat:

ss-Oligo (1,0 µg/µl)	15 µl
DNA-Eluat (ca. 1-3 µg)	28 µl
T4-Polynukleotidkinase (30 U/µl)	2 µl

Der Ansatz wurde über 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend über 5 min bei 70°C hitzeinaktiviert. Anschließend erfolgte eine Säulenaufreinigung über das „QIAQuick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen) und Elution mit 30 µl MQ-H<sub>2</sub>O.

#### 4.1.15 Dephosphorylierung von DNA-Enden mittels alkalischer Phosphatase

Falls erforderlich, wurde in Anschluss an einen Restriktionsverdau die DNA mittels QIAquick Spin-Säulen aufgereinigt, in 30 µl MQ-H<sub>2</sub>O eluiert und das gesamte Eluat über 60 min bei 37°C mit alkalischer Phosphatase (CIAP) in folgendem Ansatz inkubiert:

MQ-H <sub>2</sub> O ad 50 µl	16	µl
10 x CIAP-Reaktionspuffer (MBI Fermentas)	5	µl
DNA-Eluat (1-2 µg DNA)	28	µl
CIAP (1 U/µl) (MBI Fermentas)	1	µl

#### 4.1.16 Glätten von einzelsträngigen DNA-Enden

Zum Auffüllen überstehender, einzelsträngiger 5'-Enden und zum gleichzeitigen Entfernen einzelsträngiger 3'-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle erfolgt zunächst in Anschluss an einen Restriktionsverdau die Aufreinigung der Substrat-DNA über Gelelektrophorese und QIAquick Spin-

Säulen. Nach Elution der DNA von der Säule mittels 50 µl MQ-H<sub>2</sub>O wurde diese für 30 min bei RT in folgendem Ansatz inkubiert:

10 x T4 DNA Polymerase-Puffer (MBI Fermentas)	5 µl
100 x dNTP-Mix (20 mM)	0,5 µl
100 x BSA (1%)	0,5 µl
DNA-Eluat (ca. 1-3 µg in MQ-H <sub>2</sub> O)	48 µl
T4 DNA-Polymerase (4 U/µl) (MBI Fermentas)	1 µl

Anschließend wurde die DNA entweder erneut über QIAquick Spin-Säulen oder über Gelextraktion aufgereinigt.

#### 4.1.17 Hybridisierung von einzelsträngigen Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA

Einzelsträngige (ss), z. T. bereits 5'-phosphorylierte Oligonukleotide wurden entweder kommerziell erworben oder mittels T4-PNK selbst hergestellt. In einem Reaktionsansatz von 20 µl wurde dann ein äquimolares Verhältnis der beiden einzelsträngigen DNA-Moleküle in Gegenwart unterschiedlicher Formamidkonzentrationen wie folgt hybridisiert:

Formamidkonzentration	0%	2%	5%	7%	10%
MQ-H <sub>2</sub> O ad 20 µl	10 µl	8 µl	5 µl	3 µl	0 µl
Formamid 20%	0 µl	2 µl	5 µl	7 µl	10 µl
phosphoryliertes ss-Oligo 1 (0,5 µg/µl)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
phosphoryliertes ss-Oligo 2 (0,5 µg/µl)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Die Hybridisierung erfolgte in einem PCR-Gerät mit Deckelheizung („Progene“, Techne) nach folgendem Programm:

1. 1 Zyklus      96°C              3 min
2. 1 Zyklus      10°C              hold              ramp 1°C/min

Anschließend erfolgte wieder eine Aufreinigung des ds-Oligos für nachfolgende Ligation entweder über das “QIAquick Nucleotide Removal Kit” (Qiagen) oder mittels Gelextraktion.

#### 4.1.18 Ligation von DNA-Fragmenten

Soweit nicht anders angegeben wurden jeweils 50-100 ng linearisierte und wie in 4.1.15 beschrieben dephosphorylierte Plasmid-DNA mit einem 3-5fachen molaren Überschuss an Insert-DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 1 µl T4 DNA-Ligase in dazugehörigem Reaktionspuffer über 60 min bei RT inkubiert oder, im Falle einer „blunt end“-Ligation, über Nacht bei 4°C.

#### 4.1.19 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* DH10b

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* DH10b-Zellen wurden 50 ml BHI-Medium 1:100 mit einer ÜN-Kultur angeimpft und die Zellen bei 37°C und ca. 130-140 rpm auf einem Schüttler bis zu einer optischen Dichte von 110 KE angezogen. Anschließend wurde die Kultur in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt und 15-30 min auf Eis gekühlt. Insgesamt wurden die Zellen dreimal mit je 50 ml eiskaltem,

10 %igen Glycerol gewaschen und schließlich das Bakterienpellet in 500 µl eiskaltem, 10%igem Glycerin resuspendiert sowie in Aliquots à 100 µl bei -80°C gelagert.

#### 4.1.20 Elektroporation von *E. coli* DH10b

Zum Einbringen von rekombinanten Plasmidmolekülen in *E. coli* DH10 b-Wirtszellen wurden 5µl eines Ligationsansatzes in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und anschließend 100 µl auf Eis aufgetauter Zellen luftblasenfrei zugegeben. Nach Inkubation über 45 sec auf Eis erfolgte die Elektroporation mit Hilfe des Elektroporationsgeräts „Micropulser“ (BioRad) im Modus „Manual“ bei 2,25 kV. Unmittelbar nach dem Hochspannungspuls wurden 1000 µl vorgewärmtes TB-Medium zugegeben und der Inhalt in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zwischeninkubation über die in der folgenden Tabelle angegebene Zeitdauer bei 37°C wurden die Zellen schließlich auf die entsprechenden Selektivnährböden ausplattiert.

Antibiotikum	Ampicillin	Erythromycin	Kanamycin	Tetracyclin
Endkonzentration	100 µg/ml	600 µg/ml	100 µg/ml	20 µg/ml
Inkubationszeit	1 h	3 h	2 h	1,5 h

#### 4.1.21 Sequenzierung von DNA

Zur PCR-Sequenzierung eines Einzelstrangs doppelsträngiger Plasmid-DNA nach der Kettenabbruchmethode mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden wurden je 1 µl einer Plasmid-Midiprep bzw. 4 µl einer Plasmid-Miniprep mit einem passenden Primer mit Hilfe des „CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start“-Kit (Becton Dickinson) exakt nach Herstellerangaben in einem PCR-Gerät sequenziert und der Ansatz anschließend ebenfalls nach Angaben des Herstellers in einem „CEQ2000XL“-Kapillarsequenziergerät (Beckman Coulter, München) aufgetrennt und analysiert.

## 4.2 Arbeiten mit RNA

### 4.2.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus Bakterienzellen

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus *L. monocytogenes* wurden 5 ml einer spätlogarithmischen Kultur (180 KE) abzentrifugiert und das Pellet nach vollständiger Entfernung von Mediumresten sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Anschließend wurde das tiefgefrorene Pellet in 700  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer (Qiagen)/1%  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und die Zellen auf einer „Lysing Matrix B“ (Qbiogen/BIO 101Systems) in einem „Fast Prep FP120“-Homogenisator (Qbiogen/BIO 101Systems) dreimal über jeweils 45 sec auf Stufe 6,5 bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufgeschlossen. Die weitere Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte dann mit Hilfe des „Qiagen RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben. Schließlich wurde die aufgereinigte Gesamt-RNA in 40  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltem MQ- $\text{H}_2\text{O}$  von den Spin-Säulen eluiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.2.2 Slot-Blot

Fünf Mikrogramm Gesamt-RNA wurden in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  mit 30  $\mu\text{l}$  RNA-Denaturierungspuffer (100  $\mu\text{l}$  10 x MOPS, 500  $\mu\text{l}$  Formamid, 162  $\mu\text{l}$  37 %iges Formaldehyd) versetzt, über 5 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von je 40  $\mu\text{l}$  20 x SSC wurden die denaturierten Proben mittels Wasserstrahlpumpe und einer „Bio Dot<sup>®</sup>“-Vakuumkammer (Bio-Rad) auf eine Nylonmembran (Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>, Amersham) transferiert, die zuvor bereits über 60 min in 20 x SSC vorinkubiert wurde. Nach zweimaligen Waschen mit je 1 ml 10 x SSC pro Schlitz wurden die Nukleinsäuren durch zweistündiges Backen bei  $80^{\circ}\text{C}$  auf der Membran fixiert.

### 4.2.3 Hybridisierung und Detektion membrangebundener Nukleinsäuren mit Hilfe des „AlkPhos Direct Labelling Kit“ und „CDP-Star“

Nach der Hitze-fixation wurden die trockenen Membranen über eine Stunde bei  $68^{\circ}\text{C}$  in  $0,25\text{ ml/cm}^2$  Hybridisierungspuffer in Gegenwart von 4% „Blocking Reagent“ (beide aus dem „AlkPhos Direct Labelling Kit“ (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)) und von 0,5 M NaCl in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Parallel dazu wurden 100 ng einer PCR-Sonde mit einer thermostabilen alkalischen Phosphatase des „Labelling Reagent“ nach Herstellerangaben gekoppelt und nach beendeter Prähybridisierung dem Ansatz unmittelbar zugegeben. Die weitere Hybridisierung erfolgte dann bei gleicher Temperatur über Nacht im Schüttelwasserbad.

Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen dann zweimal über jeweils 15 min bei  $68^{\circ}\text{C}$  mit je  $5\text{ ml/cm}^2$  Waschpuffer I (2 M Harnstoff, 0,1% (w/v) SDS, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,0, 150 mM NaCl, 0,2% (w/v) „Blocking Reagent“) gewaschen und anschließend noch weitere zwei Mal für jeweils 15 min in Waschpuffer II (50 mM Tris-HCl pH 10, 100 mM NaCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ) bei RT. Nach kurzem Abtropfen wurden die Membranen mit  $30\text{ }\mu\text{l/cm}^2$  CDP-Star überschichtet und 5 min darin inkubiert. Schließlich wurden die Membranen nach kurzem Abtropfen zwischen zwei Lagen Frischhaltefolie gelegt und ein Röntgenfilm (XBA, X-Ray Retina, Berlin) in einer lichtdichten Filmkassette über die gewünschte Zeitdauer mit ihnen belichtet.

## 4.3 Proteinanalytische Verfahren

### 4.3.1 Fraktionierte Extraktion von Proteinen aus *L. monocytogenes* für SDS-PAGE

Zur Extraktion von sekretorischen Proteinen wurde der Überstand von 45 ml einer spätlogarithmischen Kultur (180 KE) nach Zentrifugation durch erneute Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C über 10 min von restlichen Bakterien befreit und anschließend die darin enthaltenen Überstandsproteine mit 5 ml 100%iger TCA auf Eis über Nacht ausgefällt. Am darauffolgenden Tag wurden die ausgefällten Proteine bei 6000 rpm und 4°C über 30 min abzentrifugiert und nach vollständiger Entfernung von TCA-Resten in 1 ml eiskaltem Aceton resuspendiert. Die Proteinsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge bei 14000 rpm und 4°C über 5 min erneut abzentrifugiert. Nach Entfernung aller Acetonreste wurden die Überstandsproteine in 450 µl 2 x-Laemmli-puffer (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% (w/v) Glycerol, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 4% (w/v) SDS, 0,005% (w/v) Bromphenolblau) gelöst, 1 µl gesättigte Tris-Lösung zugeben und 5 min bei 100°C im Heizblock gekocht.

Zur Isolation von Oberflächenproteinen nach Engelbrecht *et al.* (1996) [85] wurden 50 ml einer spätlogarithmischen Kultur (180 KE) abzentrifugiert, das bakterielle Pellet einmal mit PBS gewaschen und schließlich in 1,8 ml PBS, 1% SDS resuspendiert. Nach 20 min Inkubation unter leichtem Schütteln bei 37°C wurden die Bakterien über 20 min bei RT in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die darin gelösten Oberflächenproteine mit 200 µl 100% TCA ad 10% Endkonzentration über Nacht auf Eis ausgefällt. Nach Zentrifugation über 20 min bei 4°C und 14000 rpm wurden die Oberflächenproteine einmal mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen, in 50 µl 2 x -Laemmli-puffer gelöst und 5 min bei 100°C im Heizblock gekocht.

Zur Extraktion intrazellulärer Proteine wurde das bakterielle Pellet in 500 µl 2 x Laemmli-puffer resuspendiert und 6 mal über jeweils 30 sec auf der Geschwindigkeitsstufe 6,5 auf einer „Lysing Matrix B“ (Qbiogen/BIO 101Systems) in einem „Fast Prep FP120“-Homogenisator (Qbiogen/BIO 101Systems) bei 4°C aufgeschlossen. Nach Abzentrifugation des Zelldebris und der Glaskügelchen wurde der proteinhaltige Überstand vollständig abgenommen und 5 min bei 100°C gekocht.

### 4.3.2 Photometrische Quantifizierung von Proteinen

Die photometrische Proteinquantifizierung bei 595 nm erfolgte mit Hilfe des „BioRad Protein Assay“ (BioRad) unter Verwendung geeigneter Konzentrationsreihen von BSA nach Herstellerangaben in Halbmikroküvetten in einem UV-Spektrophotometer.

### 4.3.3 Elektrophorese von Proteinen in Polyacrylamidgelen nach Laemmli (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe erfolgte mittels vertikaler Elektrophorese in denaturierenden Polyacrylamidgelen nach Laemmli *et al.* (1970) [179].

Für Glasplatten der Größe 15 cm x 17 cm (h x b) und Spacer der Dicke von 1,5 mm wurden in einem 50 ml-Greiner-Röhrchen 30 ml Trenngel der erforderlichen Konzentration nach folgendem Schema angesetzt:

H <sub>2</sub> O	ad 30 ml
1,5 M Tris pH 8,8	7,5 ml

10 % SDS	300 µl
30 % Bisacrylamid	siehe Tabelle
10 % APS	150 µl
TEMED	15 µl

Trennbereich (kDa)	Gelkonzentration [% (w/v)]	Acrylamidlösung (ml)
60-200	8	8
16-70	10	10
12-45	12	12
< 12	15	15

Die Substanzen wurden durch mehrmaliges Invertieren des Greinerröhrchens gut gemischt und dann luftblasenfrei zwischen zwei vorbereitete Glasplatten wie in 4.12.11 beschrieben gegossen. Anschließend wurde die Lösung mit n-Butanol überschichtet. Nach dem Polymerisation des Trenngels wurde das n-Butanol mit Wasser gewaschen und für Platten obiger Größe 10 ml Sammelgel in einem 50 ml-Greinerröhrchen nach folgendem Schema angesetzt:

H <sub>2</sub> O	7,35 ml
1,0 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	100 µl
30 % Bisacrylamid	1,3 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	20 µl

Nach Einsetzen eines passenden Kammes und Polymerisation des Sammelgels erfolgte die Elektrophorese vorbereiteter Proteinproben bei 15 V/cm in einem Tris-Glyzin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,1% (w/v) SDS).

#### 4.3.4 Western-Blot

Der Transfer von Proteinen nach Elektrophorese in SDS-PAG erfolgte mittels eines "Semi Dry"-Elektroblotverfahrens nach Towbin *et al.* (1979) [336]. Hierzu wurden zunächst zwei Filterpapierstreifen von den Abmessungen des Gels mit Anodenpuffer I (300 mM Tris, 20 % Methanol) getränkt und auf die vorbefeuchtete Anodenplatte gelegt. Anschließend wurde ein weiterer, mit Anodenpuffer II (25 mM Tris, 20 % Methanol) befeuchteter Filterpapierstreifen darüber gelegt sowie darauf dann eine mit Wasser befeuchtete Nitrocellulosemembran (Hybond C) (Amersham). Auf die Nitrocellulosemembran wurde das Gel gelegt und darauf weitere drei Lagen mit Kathodenpuffer (25 mM Tris, 40 mM ε-Amino-n-capronsäure) getränkte Filterpapierstreifen. Nach Platzierung der Kathodenplatte erfolgte der Transfer über 75 - 90 min bei 0,9 mA/cm<sup>2</sup>.

Nach erfolgtem Elektrotransfer wurde die Nitrocellulosemembran aus der Apparatur entnommen und über 60 min bei RT in Blockpuffer (1 x TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 137 mM NaCl, 0,05 % Tween 20), 10 % Magermilchpulver) unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran dreimal über 10 min in 1 x TBST gewaschen und der spezifische

Erstantikörper in 1 x TBST, 1% Magermilchpulver in entsprechender Konzentration (1:200 bis 1:1000) verdünnt in einem Volumen von 100-200  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  zur Nitrocellulosemembran gegeben. Die Reaktion des Antikörpers mit seinem Antigen erfolgte über Nacht unter leichtem Schwenken bei 4°C. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal über 10 min in 1 x TBST gewaschen. Die Reaktion mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten und mit POD-konjugiertem Zweitantikörper entsprechender Konzentration (1:200 bis 1:1000) erfolgte in 100-200  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  1 x TBST, 1% Magermilchpulver über 1 Stunde bei RT. Schließlich wurde die Membran dreimal für jeweils 15 Minuten in großen Volumina von 1 x TBST gewaschen und membrangebundene Komplexe aus Erst- und Zweitantikörper mittels „ECL™ Western Blotting detection reagent“ (Amersham) nach Herstellerangaben nachgewiesen. Bei zu hohen Signalintensitäten wurde die Membran anschließend noch in Chlornaphtol-Reagenz (47 ml PBS, 3 ml 0,3 % 4-Chloro-1-naphtol in Methanol, 60  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) solange inkubiert, bis braune Banden erkennbar wurden und zur weiteren Farbtintensivierung über Nacht bei 4°C in  $\text{H}_2\text{O}$  gelagert.

#### 4.4 Bakteriologische Arbeiten mit *L. monocytogenes*

##### 4.4.1 Herstellung kompetenter *L. monocytogenes* für die Elektroporation

Fünzig Milliliter BHI-Medium wurden mit 0,5 ml ÜNK angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 90 Klett bei 37°C unter Schütteln bei 180 rpm im Brutraum angezogen. Nach Zugabe von 50 µl Penicillin G - Stammlösung (5 mg/ml in H<sub>2</sub>O) ad 5 µg/ml erfolgte eine weitere Kultivierung bis zu einer optischen Dichte von 120-130 Klett. Anschließend wurde die Kultur in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt und 30 min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C über 10 min wurde das bakterielle Pellet in 10 ml eiskaltem 3,5 x SMHEM (952 mM Sucrose, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM HEPES pH 7,2) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde es in 5 ml (1/10 Vol) eiskaltem 3,5 x SMHEM resuspendiert, wieder abzentrifugiert und schließlich in 500 µl (1/100 Vol) eiskaltem 3,5 x SMHEM resuspendiert sowie in Aliquots á 100 µl bei -80°C gelagert.

##### 4.4.2 Elektroporation kompetenter *L. monocytogenes*

Ein Aliquot elektrokompenter Zellen wurde mit 1-5 µl Plasmid-DNA 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation mit dem Elektroporationsgerät „Micropulser“ in der Betriebsart „Manual“ bei einer Spannung von 2,25 kV. Nach dem Hochspannungspuls wurde sofort 1 ml vorgewärmtes BHI-Medium zugegeben und je nach Resistenzmarker zwischen 2 h und 6 h bei 37°C zwischeninkubiert. Schließlich wurden die Zellen auf entsprechende Selektivplatten ausplattiert:

Antibiotikum	Chloramphenicol	Erythromycin	Tetracyclin
Endkonzentration	10 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml
Inkubationszeit	2 h	6 h	3 h

##### 4.4.3 Wechsel von stabilisierten Plasmiden in *L. monocytogenes* $\Delta trpS$ („Ausschütteln“)

Zur Transformation von *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$ -Zellen, die bereits ein stabilisiertes und gegen ein Antibiotikum 1 (z. B. gegen Tetracyclin in pTRPS) gerichtetes Resistenzplasmid enthalten, mit einem zweiten, ebenfalls stabilisierten Plasmid, welches Resistenz gegen ein Antibiotikum 2 (z. B. Erythromycin in pSP118-Derivaten und pCSA-Plasmiden) vermittelt, wurden diese nach Elektroporation auf das Antibiotikum 2 enthaltenden Selektivagar ausplattiert und über Nacht bebrütet. Sobald sichtbare Kolonien herangewachsen waren, wurde eine isoliert und in 3 ml BHI + Antibiotikum 2 über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer 10<sup>6</sup>-fachen Verdünnung auf Selektivagar mit Antibiotikum 2 ausplattiert und erneut über Nacht kultiviert. Von den gewachsenen Klonen wurden mindestens zehn reisoliert und nacheinander auf (i) eine Selektivplatte mit Antibiotikum 1 (z. B. Tc), (ii) eine Selektivplatte mit Antibiotikum 2 (z. B. Em) sowie (iii) eine Platte mit Listeria-Selektivagar und zuletzt (iv) eine BHI-Platte sektorförmig ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Schließlich wurde ein Klon ausgewählt, der nur auf den Platten (ii) bis (iv) gewachsen war.

Die Transformation von Bakterienzellen, die bereits ein stabilisiertes pCSA-Plasmid enthielten, mit einem zweiten, nicht-stabilisierten pCSB-Plasmid, erfolgte wie in 4.4.2 beschrieben. Es wurde immer zuerst mit pCSA-Plasmiden transformiert und nach Ausschütteln von pTRPS mit einem pCSB-Plasmid.

#### **4.4.4 Herstellung von Infektionsaliquots von *L. monocytogenes* für Zellkulturversuche**

Zur Herstellung von Infektionsaliquots für die nachfolgende Infektion von Zellkulturzellen wurden 20 ml BHI in einem 50 ml-Klettkolben 1:100 mit einer ÜNK angeimpft. Sobald die Zellen die spätlogarithmische Wachstumsphase erreicht hatten, wurden 10 ml entnommen und für 10 min auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation über 10 Minuten bei 6000 rpm und 4°C in einer Kühlzentrifuge (Minifuge RF) (Heraeus Sepatech) wurde das Pellet mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Schließlich wurden die Bakterien in 10 ml 80% PBS/20% Glycerol resuspendiert und in Aliquots á 1 ml bei -80°C bis zu maximal 3 Monaten gelagert. Vor Verwendung in Zellkulturexperimenten wurde jeweils die Lebendkeimzahl bestimmt.

#### **4.4.5 Immunfluoreszenzfärbung von Bakterien auf Deckgläschen**

Ein Milliliter einer Bakterienkultur in der spätlogarithmischen Wachstumsphase wurde in einer Tischzentrifuge über 5 min bei maximaler Drehzahl abzentrifugiert und das Bakterienpellet zweimal mit je 1 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde dieses in 100 µl 1 x PBS aufgenommen. Davon wurde die Hälfte auf Parafilm aufgetropft und ein Deckgläschen 15 min darüber liegen gelassen. Nach dem Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit wurde das Deckgläschen mit der bakterienbeschichteten Seite nach unten auf einen Tropfen 4%iges Paraformaldehyd in 30 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) gelegt und für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer zur Fixierung der adhären Bakterien darauf liegen gelassen. Danach wurde das Deckgläschen zum Waschen ca. 10 mal in 1 x PBS eingetaucht und erneut mit der bakterienbeschichteten Seite nach unten auf einen Tropfen 1 x PBS, 10 mM Glycin gelegt und 15 Minuten bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Absaugen überschüssiger Flüssigkeit wurde das Deckgläschen auf einen Tropfen mit 1 x PBS, 3 % BSA platziert und über 60 min bei RT geblockt. Das Deckgläschen wurde wieder durch mehrmaliges Eintauchen in ein Becherglas mit 1 x PBS, 1 % Triton X-100 gewaschen. Zur Reaktion mit dem spezifischen Erstantikörper wurde dieses auf einen Tropfen des Antikörpers verdünnt in 1 x PBS, 3 % BSA gelegt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde es wieder durch mehrmaliges Eintauchen in 1 x PBS, 1 % Triton X-100 gewaschen auf einen Tropfen mit konjugiertem Zweitantikörper geeigneter Verdünnung in 1 x PBS, 3 % BSA gelegt und 60 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Zum Einbetten und Mikroskopieren wurden zunächst geschmolzene, ca. 37°C warme, 1 %ige LMP-Agarose mit Vectashield® (Vector Labs) im Verhältnis 1 : 1 gemischt und davon 5 µl auf einem vorgewärmten Objektträger vorgelegt. Nach erneutem mehrmaligen Waschen wurde das Deckgläschen schließlich mit der beschichteten Seite nach unten darüber gelegt und entweder unmittelbar anschließend mikroskopiert oder über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

#### **4.4.6 Immunogoldfärbung von Oberflächenproteinen auf *L. monocytogenes***

Listerien wurden in BHI-Medium bis zur exponentiellen Phase kultiviert und anschließend zweimal mit 1x PBS gewaschen und in 1/10 des Ausgangsvolumens in 1 x PBS gründlich resuspendiert. Zur Adhäsion der Bakterien und zur Immunogold-Markierung wurden kohlebeschichtete Nickelnetze (200 mesh) verwendet. Diese wurden für 10 min mit der beschichteten Seite auf einen Tropfen der ankonzentrierten Bakteriensuspension gelegt, welcher vorher auf ein Stück Parafilm pipettiert wurde. Nachdem die überschüssige Bakteriensuspension mit einem Streifen Filterpapier von den Netzen kurz abgezogen wurde, wurden die Netze mit samt anhaftenden Bakterien wieder mit der beschichteten Seite nach unten für eine Stunde auf einen Tropfen mit Fixierlösung (frisches 4 %iges (w/v) Paraformaldehyd in 30 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7,4) gelegt. Anschließend wurde überschüssige Fixierlösung durch 10-maliges Eintauchen der Nickelnetze in eine 1 x PBS-Lösung entfernt. Zur Unterdrückung störender Hintergrundfluoreszenz durch anhaftende Paraformaldehydreste wurden die Netze zum sog. „*quenching*“ anschließend nochmals über 15 min auf eine Glyzinlösung (10 mM Glyzin in 1 x PBS) aufgelegt. Zur eigentlichen Immunfärbung wurden die Netze nacheinander für 5 min auf einen Tropfen 1 x PBS und für 5 min auf einen Tropfen der Lösung LB 1 (1% (w/v) BSA, 0,1 % (v/v) Tween 20 in 1 x PBS, sterilfiltriert (0,2 µm)) aufgelegt. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit in Lösung LB1 verdünntem primären Antikörper. Anschließend wurden die Netze durch 10-maliges Eintauchen in Lösung LB 1 gewaschen und nochmals nacheinander für jeweils 10 min zweimal auf einen großen Tropfen der Lösung LB 1 und zweimal auf einen großen Tropfen der Lösung LB 2 (0,1 % (w/v) BSA, 0,1 % (v/v) Tween 20 in 1x PBS, sterilfiltriert (0,2 µm)) weiter von anhaftenden Antikörperresten befreit. Als sekundärer Antikörper wurde passend zum Erstantikörper entweder ein Anti-Maus-IgG-Antikörper oder ein Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet, welche mit 12 nm-kolloidalem Gold gekoppelt waren. Die Antikörper wurden 1:10 in Lösung LB 2 verdünnt und das Netz für eine Stunde darauf gelegt. Zum Waschen wurden die Netze wieder 10-mal in Lösung LB 2 eingetaucht, anschließend zweimal für 10 min auf einem großen Tropfen LB 2 aufgelegt und dreimal für 5 min auf einen großen Tropfen MQ-H<sub>2</sub>O. Nach dem Trocknen wurden die so behandelten Netze bis zur elektronenmikroskopischen Betrachtung in dafür vorgesehenen Behältnissen trocken gelagert.

#### **4.4.7 Messung der GFP-Expression in Bakterienzellen mittels Durchflusszytometrie**

Die Messung der GFP-Expression in Bakterienzellen erfolgte mit Hilfe des „Epics Elite XL“-Durchflusszytometers der Firma Beckman Coulter (München). Dazu wurden die Bakterien in Flüssigkultur angezogen und zu den entsprechenden Zeitpunkten 100 µl der Kultur zu 900 µl eisgekühltem und sterilfiltriertem (0,2 µm) 1 x PBS gegeben. Nach Zentrifugation über 5 min in einer Tischzentrifuge bei maximaler Drehzahl wurde das Pellet nochmals mit 1 ml eisgekühltem und sterilfiltriertem 1 x PBS gewaschen und die GFP-Fluoreszenz von mindestens 5 x 10<sup>5</sup> Bakterien unter Verwendung eines 525 ± 15 nm Bandpassfilters gemessen.

## **4.5 Zellbiologische Arbeiten**

### **4.5.1 Lagerung von Zelllinien**

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zelllinien in flüssigen Stickstoff in einem speziellen Einfriermedium (RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS, 12% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)) aufbewahrt. Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert, auf eine Zelldichte von etwa  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml in Einfriermedium eingestellt und auf Eis abgekühlt. Je 1 ml der gekühlten Suspension wurde anschließend in beschriftete Kryoröhrchen (Greiner, Solingen) verteilt, in Zellstoff eingewickelt und über Nacht bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach 12-24 Stunden wurden die Kryoröhrchen dann in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen in einem  $37^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad rasch erwärmt und anschließend die Zellsuspension in 10 ml RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS gegeben. Nach Zentrifugation der Zellsuspension über 10 min bei 400 g und  $4^{\circ}\text{C}$  wurde der DMSO-haltige Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem vorgewärmten Medium resuspendiert.

### **4.5.2 Kultivierung permanenter Zelllinien**

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Zelllinien in RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS in T 75-Kulturflaschen (Greiner, Solingen) bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert.

### **4.5.3 Passagieren permanenter Zelllinien**

Sobald epitheliale Zellen wie Caco-2 oder COS-1 gerade konfluent gewachsen waren, wurde verbrauchtes Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt und der Zellrasen einmal mit 1x PBS-Lösung gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml unverdünnter Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Kulturflaschen für 10-20 min zurück in den Brutschrank gestellt und anschließend die trypsinisierten Zellen in frischem Medium resuspendiert. Vier Milliliter dieser Zellsuspension wurden in einer neuen T 75-Zellkulturflasche zu 16 ml warmen Medium gegeben. Bei dieser 1:5-Verdünnung erreichten die Zellen in der Regel nach ca. 2-3 Tagen wieder das Konfluenzstadium. Nicht-adhärenente Zellen wie z.B. P388.D1-M $\Phi$  oder FSDC wurden durch Abschaben mit einer in der Bunsenbrennerflamme zu einem Spatel gebogenen Pasteurpipette vom Untergrund der Zellkulturflaschen abgelöst und ebenfalls 1:5 weiter passagiert. Alle Ziellinien wurden nur bis zu maximal 20. Passage nach Auftauen verwendet.

### **4.5.4 Präparation von primären murinen DC aus Knochenmark**

Die Isolierung und Kultivierung von primären dendritischen Zellen aus Vorläuferzellen im Knochenmark (BMDC) von Mäusen erfolgte in Anlehnung an Lutz *et al.* (1999) [207]. Dazu wurden die Oberschenkelknochen von 1-3 Monate alten BALB/c-Mäusen durch Exartikulation im Hüftgelenk und Durchtrennung der Tibia unterhalb des Kniegelenks im Ganzen entfernt ohne dabei ihre Markhöhlen zu eröffnen. Anschließend wurde das Muskelgewebe durch kräftiges Abreiben mit Zellstoff vollständig entfernt und die blanken Knochen durch Einlegen in eine Petrischale mit 70% Ethanol über 2-3 min desinfiziert. Zwecks Entfernung des Alkohols wurden die Knochen in eine Petrischale mit vorgelegtem sterilen 1 x PBS überführt und anschließend die Femurepiphysen mittels einer sterilen Schere eröffnet. Mittels einer 21G-Nadel und einer 10 ml Spritze wurde das

Knochenmark aus den Markhöhlen in frisches steriles 1 x PBS gespült und Knochenmarksklumpchen durch Auf- und Abpipettieren mit einer 10 ml-Pipette aufgelöst. Die Zellsuspension wurde über 5 min bei 300 g und RT zentrifugiert und das Pellet erneut in 50 ml 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden in R10 Medium (RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 10% FCS, 50 µM BME, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) aufgenommen und die Zellkonzentration auf  $2 \times 10^5$ /ml eingestellt. Zur selektiven Anreicherung von dendritischen Zellen wurden zu 10 ml Zellsuspension 10 µl 1000x rmGM-CSF-Stammlösung (200 U/µl) ad 200 U/ml zugeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in bakteriologischen Petrischalen ( $\varnothing$  10 cm). An den Tagen 3, 5 und 8 wurden jeweils 5 ml frisches Medium mit 200 U/ml rmGM-CSF (5 µl 1000x Stammlösung) zu den Kulturen zugeben. Am Tag 10 wurde der Überstand abgenommen und die Zellen im Überstand bei 300 g und RT über 5 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 10 ml RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin pro Petrischale gewaschen und für einen anschließenden Infektionsversuch in einer 24-Napf-Zellkulturplatte auf  $5 \times 10^5$  /ml eingestellt und je 1 ml pro Napf eingesät.

#### **4.5.5 Gewinnung von humanen monozytären DC aus peripherem Blut**

Die Gewinnung von primären humanen DC aus Vorläuferzellen im peripheren Blut (hmoDC) erfolgte zusammen mit Fr. Dr. Dr. Annette Kolb-Mäurer (Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Würzburg) exakt wie in Kolb-Mäurer *et al.* (2001) [168] beschrieben.

#### **4.5.6 Vitalzellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung**

Die Zellen wurden nach Trypsinieren bzw. Abschaben in 1x PBS verdünnt und anschließend 20 µl davon mit einem gleichen Volumen Trypanblau-Gebrauchslösung (sterile Trypanblau-Stammlösung (Sigma) 1:20 mit sterilem 1 x PBS verdünnt) gemischt und ca. 2-5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 20 µl der Mischung in einer Zählkammer nach Fuchs/Rosenthal unter dem Mikroskop ausgezählt und der prozentuale Anteil gefärbter und damit avitaler Zellen in mindestens 100 Zellen bestimmt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird die Anzahl der lebenden Zellen in drei Großquadraten gezählt, gemittelt und gemäß der Formel  $\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{Lebende Zellen/Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 5000$  berechnet.

#### **4.5.7 Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT-Test**

Die Versuche zur Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT-Test wurden in 24-Napf-Zellkulturplatten durchgeführt. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurde das Medium aus den Nöpfen einer 24 Napf-Platte abgesaugt und durch 500 µl 2,5 µg/µl MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in farblosem RPMI, 10 % FCS ersetzt. Nach 3 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die MTT-Lösung abgesaugt und 500 µl 1 N HCl pro Napf zugegeben. Nach Auflösen der Zellen wurden je 100 µl der Lösung in die Nöpfe einer 96 Napf-Platte überführt und die Absorption bei 570 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Unbehandelte Kontrollzellen wurden dabei als 100% vital gesetzt.

#### **4.5.8 Durchflusszytometrische Vitalitätsbestimmung mittels 7-Aminoactinomycin D**

Die zu messenden Zellen wurden gegebenenfalls nach Trypsinierung in 500 µl 1 x PBS, 10% FCS sorgfältig resuspendiert und während der Messung auf Eis gelagert. Die 7-Aminoactinomycin-D- (7-AAD)-Stammlösung (1 mg/ml in DMSO) wurde vor Gebrauch noch 1:1 mit 1 x PBS verdünnt und 2 µl dieser verdünnten Lösung wurden zu 500 µl der Zellsuspension zugegeben. Anschließend wurden die Zellen über 10 min auf Eis gefärbt und die Anzahl 7-AAD-positiver und damit avitaler Zellen in  $1,0 \times 10^5$  Zellen unter Benutzung eines  $675 \pm 15$  nm Bandpass-Filters im Durchflusszytometer bestimmt.

#### **4.5.9 Zellzyklusmessung mittels Flusszytometrie propidiumiodidgefärbter Zellen**

Da diploide Zellen über die doppelte Menge an DNA in ihren Zellkernen verfügen, kann über die Messung des DNA-Gehalts von Zell(kern)en auf die Zellzyklusphase der Zelle zurückgeschlossen werden. Da der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) sowohl an DNA als auch an RNA bindet, wird dazu die RNA mittels RNase-Verdau abgebaut und die verbleibende Fluoreszenzintensität pro Zelle im Durchflusszytometer bestimmt. Zunächst wurden  $0,5 - 1,0 \times 10^6$  Zellen mit 1 x PBS gewaschen, trypsinisiert und in 2 ml 1 x PBS + 10 % FCS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen über 5 min bei 400 g pelletiert und das Zellpellet in 0,5 ml 1 x PBS resuspendiert. Die pelletierten Zellen wurden zum Fixieren mit 1 ml 70%igen Ethanol gemischt, erneut über 5 min bei 400 g pelletiert und mit 500 µl DNA-Färbepuffer (100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 154 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 % BSA, 0,1 % Triton X-100, 5 µg/ml RNase A, 20 µg/ml Propidiumiodid) gründlich resuspendiert. Die Färbung erfolgte über mindestens 30 min bei 4°C im Dunkeln. Anschließend erfolgte die Messung der PI-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines  $675 \pm 15$  nm Bandpass-Filters.

#### **4.5.10 Mikroinjektion von Plasmid-DNA in das Zytoplasma adhärenter Zellen**

Ein oder zwei Tage vor der Mikroinjektion wurden adhärenente Zellen in 6 cm Zellkultur-Petrischalen in RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10 % FCS so ausgesät, dass sie am Tag der Mikroinjektion in etwa semikonfluent waren. Vor der Mikroinjektion wurde das Medium abgesaugt und durch Injektionsmedium (RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10 % FCS, 20 µg/ml Gentamicin) ersetzt. Die Injektionslösung (1 µg/µl Texas Red-Dextran (MW 70 kDa), 25 ng/µl Plasmid-Midiprep in sterilfiltriertem MQ- $\text{H}_2\text{O}$ ) wurde zur Entfernung ungelöster Partikel vor der Mikroinjektion nochmals über 15 min bei 14000 rpm und 4°C in der Eppendorf Kühlzentrifuge abzentrifugiert und anschließend auf Eis gelagert. Unmittelbar vor Injektion wurden Eppendorf Femtotips mittels 10 µl-Pipette und Microloader mit 3 µl Injektionslösung luftblasenfrei beladen. Die intracytoplasmatische Mikroinjektion erfolgte dann mit Hilfe des „Transjector 5246“ der Firma Eppendorf unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop mit auf 37°C beheizbarem Objektisch und angebautem Eppendorf „Micromanipulator 5171“ bei 400facher Vergrößerung gemäß Bedienungsanleitung der Firma Eppendorf bei einem Injektionsdruck von 110 hPa und einer Injektionszeit von 500 ms. Durch die rote Fluoreszenz des koinjizierten Texas Red-Farbstoffs bei Anregung über den Grünkanal des Fluoreszenzmikroskops konnte dabei die korrekte Lokalisierung der Mikroinjektion im Zytoplasma der Zelle kontrolliert werden. Nach erfolgter Injektion von mindestens 100 Zellen pro Plasmid wurde das

Injektionsmedium durch frisches Injektionsmedium ersetzt und die Zellen bis zur mikroskopischen Auswertung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **4.5.11 Intrazytoplasmatische Mikroinjektion von Bakterien**

Die intrazytoplasmatische Mikroinjektion von Bakterien erfolgte nach Goetz *et al.* (2001) [116]. Zur Mikroinjektion wurden die Bakterien in BHI angezogen und in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Nach einmaligem Waschen in 1 x PBS wurden sie auf eine Dichte von 10<sup>6</sup> Bakterien pro ml in 1x PBS, 1 µg/µl Texas Red-Dextran (MW 70 kDa) eingestellt. Insgesamt wurden 5-8 pl dieser Suspension pro Zelle injiziert. Dazu wurden selbstgefertigte Borsilikatgaskapillaren (Sutter Instruments, Novato, CA) verwendet, die mit einem Kapillarzyher (Bachofer, Reutlingen) hergestellt wurden. Der mittlere Innendurchmesser der Kapillaren betrug dabei 0.7 µm. Die Qualität der Kapillaren und insbesondere der Kapillarspitzen wurde vor jeder Mikroinjektion mikroskopisch kontrolliert. Die Mikroinjektion selbst erfolgte wieder wie in Abschnitt 4.5.10 beschrieben. Nach der Mikroinjektion wurde das Infektionsmedium entfernt, die Zellen nochmals mit 1x PBS gewaschen und wieder frisches Medium zu den Zellen gegeben.

#### **4.5.12 Transfektion adhärenter Zellen mit Lipofectamine™ Plus™**

Ein oder zwei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion ca. 70-90% konfluent waren. Bei der Verwendung einer 24-Napf-Platte wurden gemäß Herstellerempfehlung 400 ng einer Plasmid-Midiprep mit serumfreien D-MEM ad 25 µl gemischt und anschließend 4 µl PLUS™-Reagenz (Invitrogen™, Karlsruhe) zugegeben und der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden parallel 1 µl Lipofectamine™ (Invitrogen™, Karlsruhe) mit 24 µl D-MEM gemischt und nach Ablauf der 15minütigen Inkubationszeit wurden beide Ansätze zusammengegeben und erneut 15 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurde der Kulturüberstand der zu transfizierenden Zellen abgenommen und durch 200 µl D-MEM ersetzt. Schließlich wurde der gesamte Transfektionsansatz nach Ablauf der zweiten 15-minütigen Inkubationszeit zu den Zellen gegeben und mit dem vorliegenden Medium vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das D-MEM durch 1 ml vorgewärmtes RPMI 1640, 2 mM L-Glutamine, 10% FCS, 20 µg/ml Gentamicin ersetzt.

#### **4.5.13 Infektion von adhärenenten Zellen**

Zur Herstellung des Infektionsmediums wurden die auf Eis aufgetauten Bakterien in serumfreien RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin auf die gewünschte MOI verdünnt und die Suspension unmittelbar vor Infektion im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Für eine Infektion in einer 24-Napf-Zellkulturplatte mit ca. 5 x 10<sup>5</sup> Zellen/Napf wurden dabei die der gewünschten MOI entsprechende Menge an Bakterien in 0,5 ml serumfreien Medium auf die Zellen gegeben, während bei einer Infektion in 12-Napf-Schalen (ca. 1 x 10<sup>6</sup> Zellen) mit 1 ml Bakteriensuspension infiziert wurde. Bei einer MOI von 10 wurden die Bakterien für eine Infektion in einer 12-Napf-Zellkulturplatte auf eine Konzentration von 1x 10<sup>7</sup>/ml eingestellt und für eine Infektion in einer 24-Napf-Zellkulturplatte auf eine Konzentration von 2 x 10<sup>7</sup>/ml (=1 x 10<sup>7</sup>/0,5 ml). Parallel dazu wurden die zu infizierenden Zellen einmal mit je 1 ml (24-Napf-Schale) bzw. 3 ml (12-Napf-Schale) serumfreien RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin gewaschen und anschließend mit 0,5 ml

bzw. 1 ml Infektionsmedium überschichtet. Nach einer einstündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Infektionsansätze zur Entfernung der freien Bakterien dreimal mit je 1 ml bzw. 3 ml serumfreien RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin gewaschen. Zur ausschließlichen Erfassung von intrazellulären Bakterien werden die adhärenenten Bakterien durch Inkubation in 1 ml (24-Napf-Schale) bzw. 3 ml (12-Napf-Schale) RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS in Gegenwart von Gentamicin abgetötet. Bei nicht-professionellen Phagozyten erfolgte die Inkubation über 60 min mit 100 µg/ml Gentamicin, bei Makrophagen betrug die Inkubationszeit 45 min und die Gentamicinkonzentration 50 µg/ml. Der Zeitpunkt der Zugabe der Bakterien zu den Zellen wurde als Zeitpunkt 0 Stunden p.i. (*post infection*) definiert.

#### **4.5.14 Invasions-Test**

Nach der einstündigen (Caco-2-Zellen) bzw. 45minütigen (P388.D1-Makrophagen) Infektion in 12-Napf-Zellkulturplatten wurden die Zellen dreimal mit 3 ml PBS(Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) gewaschen und anschließend in 1 ml eiskaltem MQ-H<sub>2</sub>O aufgenommen und mittels Ultraschall lysiert. Die Anzahl der intrazellulären Bakterien pro Napf wurde durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen ermittelt.

#### **4.5.15 Infektion von primären murinen BMDC**

Unmittelbar vor Infektion in einer 24-Napf-Zellkulturplatte wurden die Zellen bei 300 g und RT über 5 min abzentrifugiert und einmal mit je 1 ml 500 µl RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin durch vorsichtiges Resuspendieren und erneutes Abzentrifugieren gewaschen. Die Infektion erfolgte in 500 µl RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin über 60 min bei 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen wieder zweimal mit je 1 ml RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin durch Resuspendieren und Abzentrifugieren gewaschen und dann über 1h in je 1 ml RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS, 50 µg/ml Gentamicin inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen schließlich in je 1 ml RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS, 10 µg/ml Gentamicin aufgenommen und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **4.5.16 Infektion von hmoDC**

Die Infektion von primären hmoDC erfolgte wieder in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. Dr. Annette Kolb-Mäurer (Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Würzburg) exakt wie in Kolb-Mäurer *et al.* (2001) [168] beschrieben.

#### **4.5.17 Durchflusszytometrie fluoreszierender Säugerzellen**

Die Nöpfe der 24er Zellkulturplatten wurden zuerst mit je 1 ml 1x PBS gewaschen. Makrophagen und FSDC wurden anschließend durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in 500 µl 1 x PBS, 10% FCS resuspendiert. Adhärenente Zellen wurden mit 100 µl Trypsin/EDTA-Lösung über 15 min im Brutschrank inkubiert und anschließend ebenfalls in 500 µl 1 x PBS, 10% FCS resuspendiert. Die gleichzeitige Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte durch Färbung mit 7-AAD wie in Abschnitt 4.5.8 beschrieben. Die Messung der EGFP-Fluoreszenz erfolgte unter Verwendung eines 525 ± 15 nm Bandpassfilters. Pro Versuch wurde gleichzeitig die EGFP- und 7-AAD-Fluoreszenz gemessen und so die Anzahl 7-

AAD-negativer, EGFP-exprimierender Zellen in einer Gesamtzahl von mindestens  $1 \times 10^5$  Zellen bestimmt.

#### **4.5.18 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von adhärennten Zellen auf Deckgläschen für Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Anfärbung von intrazellulären Bakterien wurden die Wirtszellen vor der Infektion auf runden Deckgläsern kultiviert. Die Zellen wurden analog der in Abschnitt 4.15.13 beschriebenen Vorgehensweise infiziert, gewaschen und bis zum Ende des Versuchs in RPMI 1640, 2 mM L-Glutamine, 10% FCS, 20 µg/ml Gentamicin kultiviert. Die infizierten Zellen wurden zweimal mit  $1 \times$  PBS( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) und einmal mit PHEM (10 mM EGTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 60 mM PIPES, 23 mM HEPES, pH 6,9) gewaschen und anschließend durch Inkubation über 60 sec in 0,25 % (v/v) Triton X-100 /PHEM permeabilisiert. Zur Fixierung der Zellen wurden die Deckgläser in einer Glasschale für 3 min in  $-20^\circ\text{C}$  kaltes Aceton gelegt und anschließend luftgetrocknet. Zur Immunfärbung wurde ein Tropfen des verdünnten primären Antikörpers auf ein Stück Parafilm vorgelegt und das Deckglas für eine Stunde mit der zellbeschichteten Seite nach unten darauf gelegt. Dabei erfolgten wieder alle Inkubationsschritte der Immunfärbung in einer feuchten Kammer. Das Waschen des Präparates erfolgte durch 10 maliges Eintauchen des Deckglases in ein mit  $1 \times$  PBS gefülltes Becherglas. Nachdem mit einem Streifen Filterpapier restliches  $1 \times$  PBS vom Präparat entfernt wurde, wurde das Präparat für 45-60 min auf einen Tropfen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper gelegt. Nach erneutem Waschen des Präparats mit  $1 \times$  PBS wurde das Deckglas wieder vorsichtig von überschüssigem  $1 \times$  PBS befreit und luftblasenfrei auf einen Objektträger mit ca. 5 µl Einbettmedium (Vectashield®, Fa. Vector Labs) aufgelegt. Nach dem Entfernen überschüssigen Einbettmediums wurde der Rand des Deckglases mit einem durchsichtigen Nagellack versiegelt und unmittelbar anschließend mikroskopiert.

#### **4.5.19 *In vitro*-Antigenpräsentation**

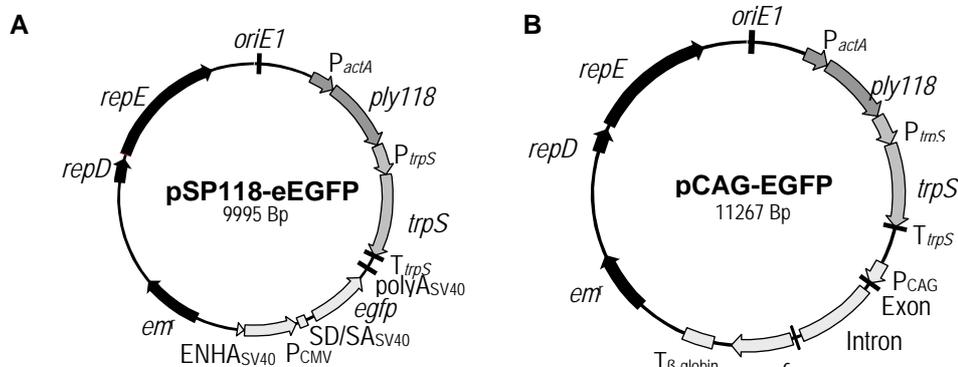
Die Messung der *in vitro*-Antigenpräsentation nach Infektion von primären Makrophagen aus dem Knochenmark von CB6-Mäusen bzw. von IC21-Makrophagen mit verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämmen erfolgte durch Herrn Dr. Gernot Geginat (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Fakultät für klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg) wie in Geginat *et al.* (1999) [108] angegeben.

## 4.6 Konstruktion von Plasmiden zur Expression von Reportergenen mit Hilfe von *L. monocytogenes*

Sämtliche molekularbiologische Standardoperationen wie Restriktionsverdau, Gelextraktion, Ligation, Transformation, Sequenzierung etc. wurden exakt wie in Abschnitt 4.1 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide kann der Tabelle 3.5 entnommen werden. Ferner sind alle in dieser Arbeit entstandenen Plasmide sowie die verwendeten Ausgangsplasmide in Abschnitt 3.6 und die entsprechenden Stämme in Abschnitt 3.10 zusammengestellt.

### 4.6.1 Konstruktion der Plasmide pSP118-eEGFP und pCAG-EGFP

Zur Konstruktion von Plasmid pSP118-eEGFP wurden die beiden komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide „SV40 72bp repeat(+)“ und „SV40 72bp repeat(-)“ zu einem Doppelstrang hybridisiert und anschließend am 5'-Ende phosphoryliert. Das so erzeugte Fragment mit *Pst*I-kompatiblen Einzelsträngenden wurde dann über die *Pst*I-Schnittstelle in den Vektor pSP118- $P_{CMV}$  kloniert und die korrekte Lage und Orientierung des Fragments mittels automatischer Sequenzierung mit den Primern „pSPxPcmvfor“ und „pSPxPcmvrev“ überprüft. Anschließend wurde das so entstandene Plasmid mit *Not*I linearisiert und ein über *Not*I-Verdau aus pSP118-EGFP erhaltenes *egfp*-Fragment einkloniert. Das so entstandene Expressionsplasmid pSP118-eEGFP enthält unmittelbar vor den CMV-Promotor ( $P_{CMV}$ ) und in gleicher Orientierung wie dieser einen 72 Bp langen Abschnitt des SV40-Enhancers ( $ENHA_{SV40}$ ). Der Austausch des Plasmids pTRPS gegen das Plasmid pSP118-eEGFP in Stamm WL-140 ergab Stamm D1.



**Abbildung 4.2:** Karten der eukaryontischen Expressionsplasmide pSP118-eEGFP (A) und pCAG-EGFP (B). Für Details siehe Text.

Zur Konstruktion des Plasmids pCAG-EGFP wurde mittels Doppelverdau mit *Sph*I und *Hind*III ein 2,3 kB großes, den  $\beta$ -Aktinpromotor ( $P_{CAG}$ ) enthaltendes Fragment ( $P_{CAG}$ - $T_{\beta\text{-globin}}$ ) aus dem Vektor pBacMam-2 isoliert. Anschließend wurden die einzelsträngigen Enden mittels Behandlung mit T4-DNA-Polymerase geglättet und mittels T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Parallel dazu wurde das Plasmid pSP1- $P_{CMV}$  mit *Pst*I und *Sal*I verdaut. Das hierbei entstandene, 6,7 kB große Fragment *em*<sup>r</sup>-*repD*-*repE*- $P_{actA}$ -*ply118* wurde zur Erzeugung glatter DNA-Enden ebenfalls mit T4-DNA-Polymerase und T4-Polynukleotidkinase behandelt und mit dem  $\beta$ -Aktinpromotorfragment „*blunt end*“ ligiert. Da beim Verdau von pSP1- $P_{CMV}$  mit *Pst*I und *Sal*I ebenfalls ein das *trpS*-Gen enthaltendes Fragment herausfällt, musste dieses in einem weiteren Zwischenschritt über *Sal*I in den

rekombinanten Vektor wieder einkloniert werden. Durch erneute Sequenzierung mit dem Primer „trpScheckfor“ konnte die korrekte Orientierung des *trpS*-Fragments relativ zum Ausgangsvektor pSP1-P<sub>CMV</sub> bestätigt werden. In den Vektor wurde dann wie oben beschrieben *egfp* über *NotI* einkloniert und das erhaltene Plasmid pCAG-EGFP mittels der Primer „pSPxPcmvfor“ und „pSPxPcmvrev“ erneut sequenziert. Die Transformation von Stamm WL-140 mit Plasmid pCAG-EGFP und Ausschütteln des Plasmids pTRPS resultierte in Stamm D2.

#### 4.6.2 Konstruktion von Plasmiden zur bakteriellen Übertragung von mRNA in Säugerzellen

Das System zur bakteriellen Übertragung von mRNA in Säugerzellen mittels *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  basiert auf den beiden Plasmiden pCSA1 und pCSB0 und ihren Derivaten.

##### 4.6.2.1 Konstruktion der pCSA-Plasmide

Ebenso wie die Plasmide pSP118-eEGFP und pCAG-EGFP sind auch alle pCSA-Plasmide Derivate von Plasmid pSP0 bzw. pSP118 (siehe Abschnitt 3.6).

Zur Konstruktion von Plasmiden, die das Gen für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 (*polT7*) enthalten, wurde mittels PCR mit der Pfu-DNA-Polymerase und den Primern „PoIT7-1“ und „PoIT7-3(*NotI*/*PstI*)“ sowie dem Plasmid pPOLT7 [54] ein 2,7 kB großes, das gesamte *polT7* enthaltendes Fragment amplifiziert. Mittels der „Primer ActA-2“ und „ActA-3(*SacI* *NotI*)“ und genomischer DNA aus *L. monocytogenes* EGD-e wurde parallel dazu mit Hilfe der Pfu-DNA-Polymerase ein 250 Bp großer Bereich des *actA*-Promotors ( $P_{actA}$ ) amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde mit *SacI* und das *polT7*-Fragment mit *PstI* verdaut und beide zusammen in einem Schritt in Plasmid pUC18 einkloniert. Nach Ausschluss von Sequenzfehlern mittels Sequenzierung mit den Primern „M13 reverse“, „M13 universe“ und „T7RNAPseq1“ bis „T7RNAPseq8“ wurde des rekombinante, 2,9 kB große  $P_{actA}$ -*polT7*-Fragment dann mittels *PstI*/*SacI*-Verdau in das Plasmid pSP0 umkloniert und somit Plasmid pCSA0 erhalten. Die Umklonierung des  $P_{actA}$ -*polT7*-Fragments in das Plasmid pSP118 ergab analog Plasmid pCSA1. Elektroporation von Plasmid pCSA0 in *L. monocytogenes* WL-140 und Ausschütteln von pTRPS ergab Stamm S6. Analog ergab die Elektroporation von Plasmid pCSA1 in *L. monocytogenes* WL-140 bzw. *L. monocytogenes* WL-142 mit nachfolgendem Ausschütteln von pTRPS die Stämme S12 bzw. S65. Elektroporation von Plasmid pFLO1 in Stamm S12 ergab Stamm S13.

Um Plasmid pCSA2 zu konstruieren, wurde das *polT7*-Gen mittels der beiden Primer „PoIT7-1(*NotI*/*SacI*)“ bzw. „PoIT7-3(*NotI*/*PstI*)“ und der Pfu-DNA-Polymerase wieder von Plasmid pPOLT7 amplifiziert und über *PstI* und *SacI* in pUC18 einkloniert und anschließend wie oben beschrieben zur Kontrolle sequenziert. Nach Ausschluss von Mutationen in *polT7* wurde dieses wieder über *PstI*/*SacI* in pSP118 einkloniert und somit Plasmid pCSA2 erhalten. Elektroporation von pCSA2 in *L. monocytogenes* WL-140 und Ausschütteln von pTRPS ergab Stamm S29.

Zur Synthese von Plasmid pCSA3 wurde mit Hilfe der beiden Primer ActA-1(*XmaI*/*HindIII*) und ActA-2 wieder ein ca. 250 Bp großer Abschnitt des *actA*-Promotors aus genomischer DNA von *L.*

*monocytogenes* EGD-e amplifiziert und *blunt end* in das mit *SmaI* linearisierte Plasmid pCSB2 (siehe Abschnitt 4.6.2.2) einkloniert. Nach Sequenzüberprüfung mittels der Primer „M13 reverse“, „ActA-1(*XmaI*/*HindIII*)“ und „ActA-2“ wurde das rekombinante Fragment  $P_{actA}$ -IRES<sub>EMCV</sub>-*egfp* dann über *SacI*/*PstI* in Plasmid pSP118 einkloniert und damit Plasmid pCSA3 erhalten. Elektroporation von pCSA3 in *L. monocytogenes* WL-140 und Ausschütteln von pTRPS ergab Stamm S57.

Zur Erzeugung von Plasmid pCSA4 wurde mit Hilfe der beiden Primer „gfp(-)(*PstI*)“ und „gfp(+“ sowie der Pfu-Polymerase das gesamte, 737 Bp große *gfpmut2*-Gen des Plasmids pKEN amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde dann nach Aufreinigung mit *PstI* verdaut und am 5'-Ende phosphoryliert. Parallel dazu wurde ein 250 Bp großer Bereich des *actA*-Promoters unter Verwendung der beiden Primer „ActA-2“ und „ActA-3(*SacI*/*NotI*)“ sowie der Pfu-Polymerase und genomischer DNA von *L. monocytogenes* EGD-e als Template amplifiziert. Nach *SacI*-Verdau und 5'-Phosphorylierung wurden die beiden Fragmente in einem Schritt in mit *SacI*- und *PstI*-linearisierten pUC18 einkloniert und das so erhaltene rekombinante Fragment  $P_{actA}$ -*gfp* mit Hilfe der Primer „M13 universe“, „M13 reverse“, „gfp(-)(*PstI*)“ und „gfp(+“ sequenziert. Anschließend wurde es über einen erneuten *SacI*/*PstI*-Verdau in pSP118 umkloniert und so Plasmid pCSA4 erhalten. Die Elektroporation von pCSA4 in *L. monocytogenes* WL-140 bzw. *L. monocytogenes* WL-142 und Ausschütteln von pTRPS ergab Stamm S52 bzw. S54.

Um Plasmid pCSA5 zu erhalten, wurde Plasmid pSP0 mit den Enzymen *SacI* und *PstI* geschnitten und anschließend das Fragment  $P_{T7}$ -SD-*gfp*- $T_{T7}$ -Fragment entsprechend wie in Abschnitt 4.6.2.2 beschrieben in pSP0 einkloniert. Elektroporation von pCSA5 in *L. monocytogenes* WL-140 und Ausschütteln von pTRPS ergab Stamm S5.

#### 4.6.2.2 Konstruktion der pCSB-Plasmide

Alle pCSB-Plasmide sind Derivate von Plasmid pFLO1 und als solche im Gegensatz zu den pCSA-Plasmiden nicht in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  stabilisiert.

Zur Herstellung eines Plasmids für die Expression von Reportergenen mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase in *L. monocytogenes* wurden zunächst die beiden Paare einzelsträngiger komplementärer Oligonukleotide „T7-EPK anti-s 2“ / „T7-EPK s-1“ und „T7-EPK s-2“ / „T7-EPK anti-s 1“ jeweils miteinander hybridisiert und anschließend die beiden resultierenden Doppelstränge mittels rekombinanter PCR mit Hilfe der Pfu-DNA-Polymerase und den beiden Primern „T7-EPK s“ und „T7-EPK anti-s“ miteinander verbunden und amplifiziert. Die resultierende 224 Bp große T7-Expressionskassette ( $P_{T7}$ - $T_{T7}$ ) wurde zur Sequenzkontrolle über die *PstI*- und *SacI*-Schnittstelle in das Plasmid pUC18 einkloniert, mit Hilfe der beiden Primer M13 universe und M13 reverse sequenziert und anschließend wieder über einen *SacI*- und *PstI*-Verdau in Plasmid pFLO1 umkloniert. Das daraus resultierende Plasmid wurde pCSB0 getauft. Plasmid pCSB0 enthält somit eine Variante des  $\phi 10$ -Promotors aus dem Bakteriophagen T7 ( $P_{T7}$ ) mit zugehöriger Terminatorsequenz ( $T_{T7}$ ) und dazwischen eine „multiple cloning site“ (MCS) mit Schnittstellen für die Enzyme *SmaI*/*XmaI*, *SacII*, *NotI*/*EagI*, *SphI*, *SpeI*, *BamHI*.

Durch Restriktionsverdau des Plasmids pIRES2-EGFP mit *Xma*I und *Not*I wurde ein 1,3 kB großes Fragment isoliert, welches das EGFP-Gen (*egfp*) zusammen mit der *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES) aus dem Encephalomyocarditisvirus (EMCV) enthält. Dieses wurde über die *Xma*I- und *Not*I-Schnittstellen in Plasmid pCSB0 inkloniert und dadurch Plasmid pCSB1 erhalten. Elektroporation von pCSB1 in die Stämme S6, S12, S21, S29 und S65 ergab jeweils die Stämme S19, S15, S22, S31 und S68.

Um ein Plasmid zu erhalten, welches zwar wie pCSB1 IRES<sub>EMCV</sub>-*egfp* enthält, aber kein P<sub>T7</sub> und T<sub>T7</sub>, wurde Plasmid pIRES2-EGFP mit *Dra*I und *Pst*I verdaut und das IRES<sub>EMCV</sub>-*egfp*-enthaltende Fragment anschließend in das mit *Sma*I- und *Pst*I-linearisierte Plasmid pFLO1 inkloniert. Das so erhaltene Plasmid wurde pCSB2 genannt. Elektroporation von pCSB2 in Stamm S12 ergab Stamm S23.

Um des weiteren ein Plasmid zu erhalten, welches zwar sowohl den T7-Promotor und T7-Terminator als auch *egfp* enthält, aber kein IRES<sub>EMCV</sub>, wurde das *egfp*-enthaltende *Not*I-Fragment aus pSP118-EGFP in pCSB0 kloniert und so Plasmid pCSB3 erzeugt. Elektroporation von pCSB3 in Stamm S12 ergab Stamm S25.

Um das Reporter gen *gfp* mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase in *L. monocytogenes* zu exprimieren, wurde das Plasmid pKEN mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Xma*I geschnitten und ein 1 kB großes Fragment isoliert, welches das gesamte *gfp*-Gen enthält zusammen mit einer prokaryontischen Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz, SD) für die Translation in *L. monocytogenes*. Dieses wurde dann über die *Nsi*I- und *Xma*I-Schnittstellen in Plasmid pUC18-P<sub>T7</sub>-T<sub>T7</sub> inkloniert und das daraus resultierende Plasmid pUC18-P<sub>T7</sub>-SD-*gfp*-T<sub>T7</sub> mit *Sac*I und *Pst*I geschnitten. Das daraus freiwerdende P<sub>T7</sub>-SD-*gfp*-T<sub>T7</sub>-Fragment wurde dann in pFLO1 kloniert und das rekombinante Plasmid pCSB4 genannt. Elektroporation von pCSB4 in die Stämme S6, S12, S29 und S65 ergab jeweils die Stämme S9, S17, S33 und S67.

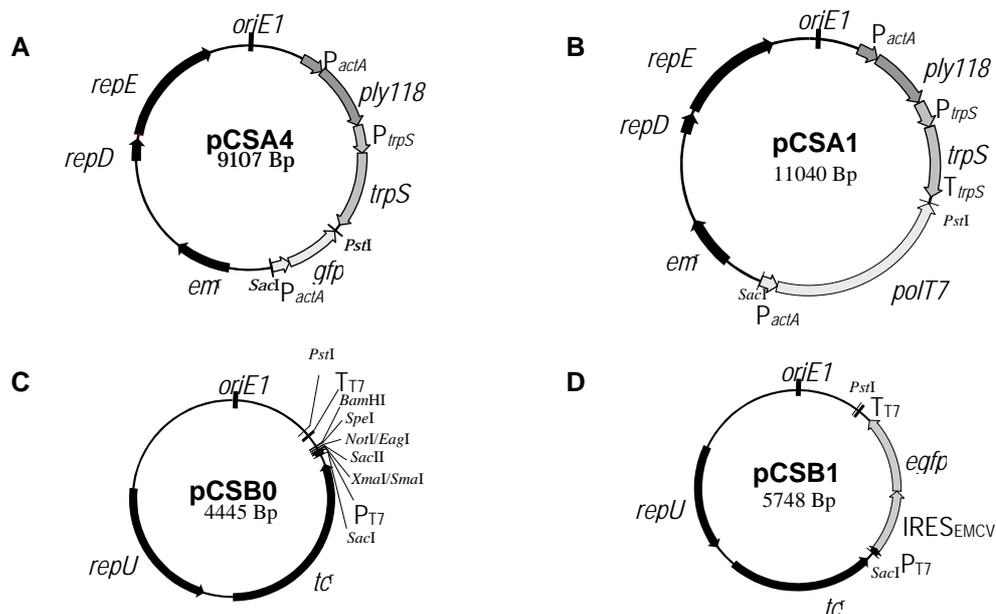
Plasmid pCSB5 enthält im Gegensatz zu Plasmid pCSB1 am 3'-Ende des *egfp*-Gens noch einen Abschnitt mit 98 Adeninresten. Dazu wurden die beiden einzelsträngigen Oligonukleotide „Poly (A)“ und „Poly (T)“ nach Phosphorylierung ihrer 5'-Enden miteinander hybridisiert und der entstehende Doppelstrang über seine zu *Not*I kompatiblen einzelsträngigen Enden in das mit *Not*I-linearisierte Plasmid pCSB1 inkloniert. Die korrekte Orientierung des Poly A/T-Abschnitts relativ zum *egfp* wurde über Kontrollverdau mit *Not*I und *Eag*I überprüft. Elektroporation von pCSB5 in Stamm S12 ergab Stamm S63.

Zur eukaryontischen Transkription von IRES<sub>EMCV</sub>-*egfp* wurde zuerst Plasmid pFLO1 mit *Pst*I und *Sma*I geschnitten sowie Plasmid pIRES2-EGFP mit den Enzymen *Dra*I und *Nsi*I. Anschließend wurde das 3,3 kB große, P<sub>CMV</sub>-IRES<sub>EMCV</sub>-*egfp*-enthaltende Fragment isoliert und mit dem geschnittenen Vektor pFLO1 ligiert. Das so entstandene Plasmid wurde pCSB6 benannt. Elektroporation von pCSB6 in Stamm S12 ergab Stamm S37.

Für Versuche zur Antigenpräsentation wurde Plasmid pCSB7 hergestellt, welches das Gen für eine nicht-sezernierte Variante des Ovalbumins (*ova<sub>cyt</sub>*) enthält. Dazu wurde zum einen das Plasmid pSP118-OVA<sub>cyt</sub> mit *NcoI* und *NotI* verdaut und ein 786 Bp großes, *ova<sub>cyt</sub>*-enthaltendes Fragment isoliert. Parallel dazu wurde das Plasmid pIRES2-EGFP mit den Enzymen *NcoI* und *XmaI* verdaut und ein IRES2-enthaltendes, 596 Bp großes Fragment isoliert. Beide Fragmente wurden in einem Schritt mit Plasmid pCSB0 ligiert, welches zuvor mit *XmaI* und *NotI* linearisiert wurde. Das so entstandene Plasmid wurde pCSB7 genannt. Elektroporation von pCSB5 in Stamm S12 ergab Stamm S62N.

Zur Expression der T7 RNA-Polymerase von Plasmid pFLO1 wurde dieses mit *SacI* und *PstI* linearisiert und das *P<sub>actA</sub>-polT7*-Fragment aus Abschnitt 4.6.2.1 entsprechend einkloniert. Das so erhaltene Plasmid wurde pCSB8 genannt. Elektroporation von pCSB8 in Stamm S5 ergab Stamm S8.

Abbildung 4.3 gibt die Ausgangsplasmide des Zweiplasmidsystems zur Übertragung von *egfp*-codierender mRNA auf eukaryontische Wirtszellen mit Hilfe von *L. monocytogenes*  $\Delta$ *trpS* wieder. Stamm S15 enthält die beiden Plasmide pCSA1 und pCSB1, Stamm S19 die Plasmide pCSA0 und pCSB1.



**Abbildung 4.3:** Derivate der Plasmide pSP0 (A und B) und pFLO1 (C und D) für die Expression von GFP von einem in *L. monocytogenes*  $\Delta$ *trpS* stabilisierten Plasmid sowie für bakterielle Übertragung von RNA auf Säugerzellen mittels *L. monocytogenes*  $\Delta$ *trpS*.

A. Plasmidkarte des Plasmids pCSA4 für die stabilisierte GFP-Expression in *L. monocytogenes*  $\Delta$ *trpS*.

B. Plasmid pCSA1 trägt das Gen für die T7-RNA-Polymerase *polT7* sowie das Gen für das Phagenlysin *ply118*, beide unter der transkriptionellen Kontrolle des *act4*-Promotors *P<sub>actA</sub>*. Gleichzeitig ist es im Gegensatz zu den pCSB-Plasmiden in *L. monocytogenes*  $\Delta$ *trpS* durch eine Kopie des *trpS*-Gens stabilisiert.

C und D. Die beiden Plasmide pCSB0 (C) und pCSB1 (D) enthalten einen T7-RNA-Polymerase-spezifischen Promotor *P<sub>T7</sub>* mit dazugehörigen Terminator *T<sub>T7</sub>*. Im Unterschied zum Grundplasmid pCSB0 enthält Plasmid pCSB1 noch das *egfp*-Gen sowie das IRES-Element des Encephalomyocarditisvirus IRES<sub>EMCV</sub>.

#### 4.6.3 Konstruktion von Plasmiden zur Expression zellwandverankerter Proteine in *L. monocytogenes*

Die Verankerung heterologer Proteine in der Zellwand von *L. monocytogenes* erfolgte über das LPXTG-Sequenzmotiv von Internalin A und unter Verwendung der Promotoren der Gene *actA* und *hly* aus *L. monocytogenes* EGD-e. Einen Überblick über die hierzu erfolgten Klonierungen bietet Abbildung 4.4.

Zunächst wurde ein jeweils ca. 200 Bp großer Abschnitt des Promotorbereichs von *hly* und *actA* zusammen mit einem Bereich des zugehörigen Gens amplifiziert, welcher für das Sekretionssignal der zugehörigen Proteine codiert. In einer Pfu-PCR wurden die Primerkombinationen „ActA-1 (*Bam*HI)“/„ActA-2 (*Nsi*I)“ und „hly-1 (*Bam*HI)“/„hly-2 (*Nsi*I)“ sowie genomische DNA von *L. monocytogenes* EGD-e als Template verwendet (Tabelle 4.1). Anschließend wurden die Produkte nach Gelaufreinigung *blunt end* in das mit *Xma*I-linearisierte Plasmid pUC18 zwischenkloniert. Entsprechend wurde auch der Abschnitt von *inlA*, der für den C-terminalen Bereich von InlA mit der Zellwandverankerungssequenz LPXTG codiert, sowie der zugehörige Transkriptionsterminator mit Hilfe der Primer „inlA-1 (*Nsi*I)“/„inlA-2“ über eine Pfu-PCR amplifiziert und ebenfalls *blunt end* über die *Xma*I-Schnittstelle in pUC18 kloniert. Nach Sequenzkontrolle mit Hilfe der beiden Primer „M13 reverse“ und „M13 universe“ wurden die Promotorfragmente über die *Xba*I/*Nsi*I-Schnittstellen aus den so gewonnenen Plasmiden pUC18-(PS)<sub>*actA*</sub> bzw. pUC18-(PS)<sub>*hly*</sub> in Plasmid pUC18-A<sub>*inlA*</sub> umkloniert. Die entstandenen Plasmide pUC18-(PS)<sub>*actA*</sub>-A<sub>*inlA*</sub> und pUC18-(PS)<sub>*hly*</sub>-A<sub>*inlA*</sub> dienen dann als Ausgangskonstrukte für die Klonierung von Antigenen bzw. Reporterproteinen über die *Nsi*I-Schnittstelle für die zellwandverankerte Expression in *L. monocytogenes*.

Tabelle 4.1: Primer und Produkte für die Klonierung zellwandverankerter und sezernierter Proteine in *L. monocytogenes*

Abk.	Primer 1	Primer 2	Länge	Amplifizierter Bereich
(PS) <sub><i>actA</i></sub>	ActA-1 ( <i>Bam</i> HI)	ActA-2 ( <i>Nsi</i> I)	324 Bp	Promotorbereich von <i>actA</i> inklusive der ersten 29 AS von ActA
(PS) <sub><i>hly</i></sub>	hly-1 ( <i>Bam</i> HI)	hly-2 ( <i>Nsi</i> I)	315 Bp	Promotorbereich von <i>hly</i> inklusive der ersten 25 AS von LLO
A <sub><i>inlA</i></sub>	inlA-1 ( <i>Nsi</i> I)	inlA-2	429 Bp	135 AS des C-Terminus von InlA mit LPXTG-Anker und Terminator
T <sub><i>inlA</i></sub>	inl A-Terminator ss (+)	inl A-Terminator ss (-)	76 Bp	Stopcodon und Terminator von <i>inlA</i>
ActA	5' <i>actA</i> ( <i>Nsi</i> I)	3' <i>actA</i> ( <i>Nsi</i> I)	637 Bp	AS40-AS273 von ActA
GFP	<i>gfp</i> (+) ( <i>Nsi</i> I)	<i>gfp</i> (-) ( <i>Nsi</i> I)	737 Bp	AS2-AS238 von GFP
OVA	5' OVA C-Terminus ( <i>Nsi</i> I)	5' OVA C-Terminus ( <i>Nsi</i> I)	751 Bp	AS146-AS386 des OVA-Proteins mit CD4- und CD8-Epitop

Zum Vergleich der Expression von sezernierten mit zellwandverankerten Proteinen in *L. monocytogenes* wurden ferner die Oligonukleotide „inl A-Terminator ss(+)" und „inl A-Terminator ss(-)" hergestellt, die nur das Stopcodon sowie den Transkriptionsterminator von *inlA* umfassen. Nach Hybridisierung und Phosphorylierung ihrer 5'-Enden wurden diese zusammen mit den

Promotorfragmenten, welche wieder über Verdau von pUC18-(PS)<sub>actA</sub> bzw. pUC18-(PS)<sub>hly</sub> mit *Xba*I und *Nsi*I gewonnen wurden, in einem Schritt in den mit den Enzymen *Xba*I und *Xma*I geschnittenen Vektor pUC18 kloniert und dadurch die beiden Plasmide pUC18-(PS)<sub>actA</sub>T<sub>inlA</sub> bzw. pUC18-(PS)<sub>hly</sub>T<sub>inlA</sub> erhalten. Zur Synthese der entsprechenden Reporterproteine wurde das Gen für GFP bzw. Abschnitte der Gene für ActA und Ova mittels Pfu-PCR und den in Tabelle 4.1 angegebenen Primern amplifiziert und die Produkte über *Nsi*I in die Plasmide pUC18-(PS)<sub>actA</sub>-A<sub>inlA</sub>, pUC18-(PS)<sub>hly</sub>-A<sub>inlA</sub>, pUC18-(PS)<sub>actA</sub>-T<sub>inlA</sub> und pUC18-(PS)<sub>hly</sub>-T<sub>inlA</sub> einkloniert. Nach Sequenzierung und Überprüfung der korrekten Orientierung der Fragmente wurden diese dann zusammen mit den anfusionierten Promotor- und Ankerabschnitt in das in *L. monocytogenes*  $\Delta$ trpS stabilisierte Shuttleplasmid pSP0 über die *Pst*I/*Sac*I-Schnittstellen einkloniert. Auf diese Weise wurden die Plasmide pHAA, pAGA, pHGA, pAOA, pHOA, pAOT und pHOT erhalten. Elektroporation von *L. monocytogenes* WL-142 mit pHAA und nachfolgendes Ausschütteln von pTRPS ergab dann Stamm BK. Elektroporation von *L. monocytogenes* WL-140 mit den Plasmiden pAGA, pHGA, pAOA, pHOA, pAOT und pHOT und anschließendes Ausschütteln von pTRPS ergab jeweils die Stämme A27, A29, A28, A30, A54 und A56.

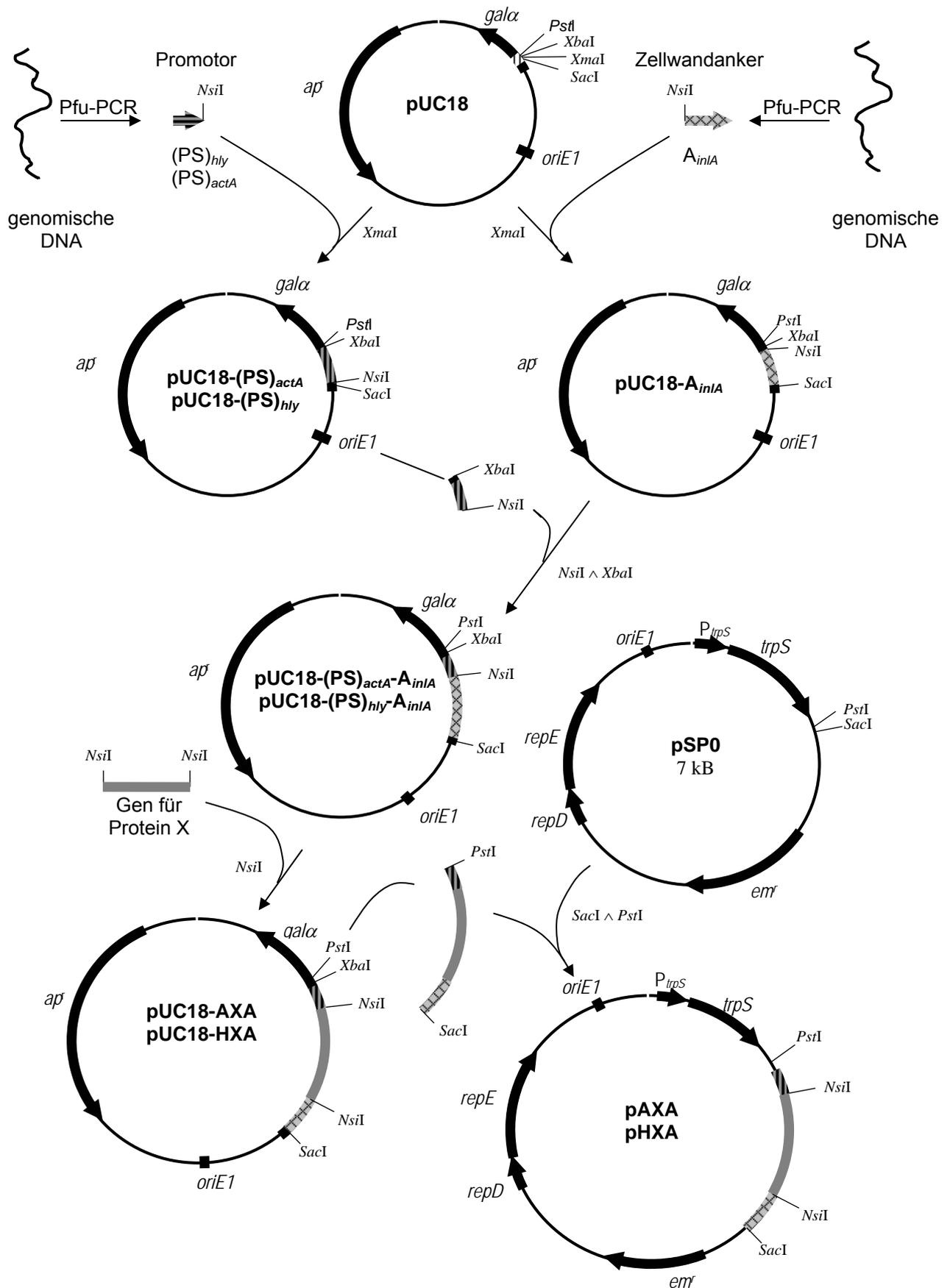
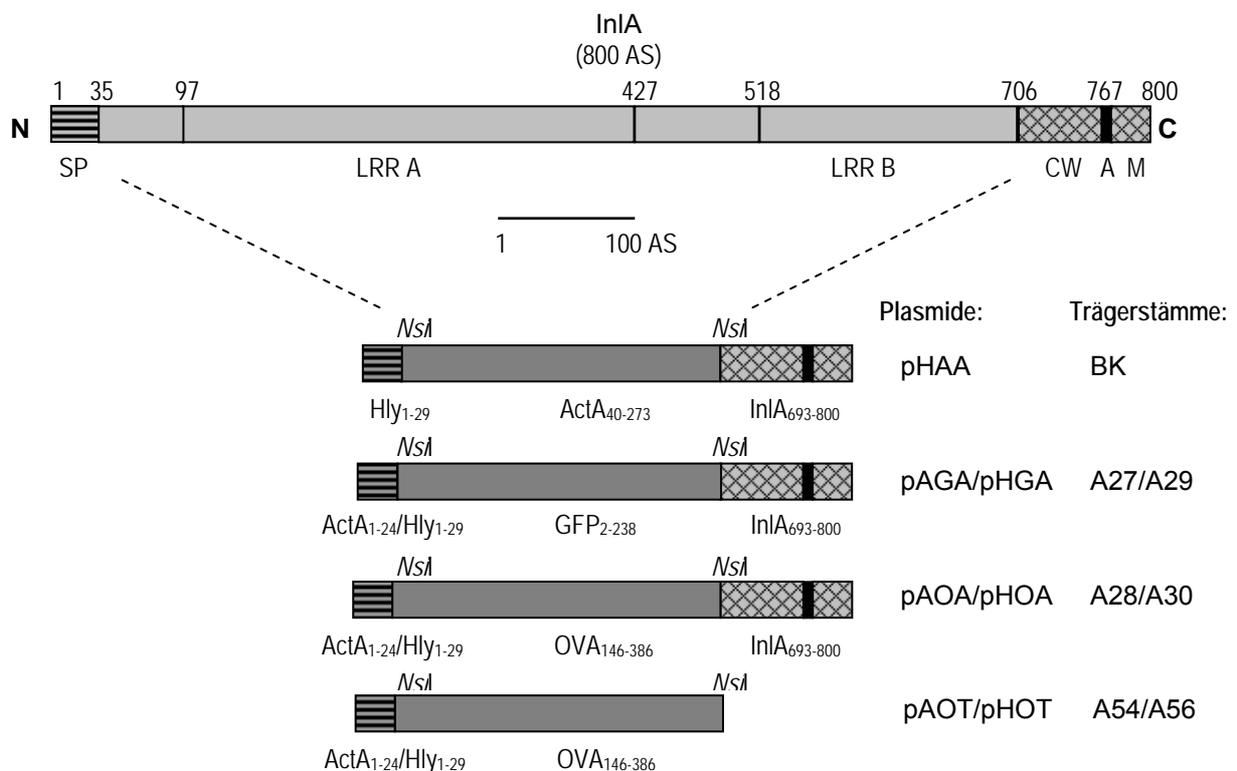


Abbildung 4.4: Strategie zur Klonierung zellwandverankerter Proteine (X) in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$ . Für Details siehe Text.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Verankerung von heterologen Proteinen in der Zellwand von *L. monocytogenes*

Die kovalente Verankerung von heterologen Proteinen am Peptidoglykangerüst der Zellwand von *L. monocytogenes* erfolgte über das LPXTG-Ankermotiv von Inl A (Bereich A im InlA-Molekül, Abbildung 5.1). Dabei wurde ein ca. 670 Aminosäuren langer Abschnitt des InlA-Proteins, welcher das InlA-Signalpeptid (SP) sowie die leucinreichen Repeatsabschnitte A und B umfasst (LRR A und LRR B, Abbildung 5.1), durch das zu verankernde heterologe Protein ersetzt. Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 4.4 gezeigt sowie im Detail in Abschnitt 4.6.3 beschrieben. Zuerst wurden die Promotoren von *actA* und *hly* zusammen mit den für die entsprechenden Sekretionssignale der zugehörigen Proteine ActA bzw. LLO codierenden Bereiche in pUC18 kloniert und anschließend genetisch mit dem für den C-Terminus von InlA codierenden Abschnitt fusioniert. Die so hervorgegangenen Plasmide pUC18-(PS)<sub>actA</sub>-A<sub>inlA</sub> und pUC18-(PS)<sub>hly</sub>-A<sub>inlA</sub> (Abbildung 4.4) dienen dann als Ausgangsvektoren, in welche die codierenden Abschnitte der zu verankernden Proteine einkloniert wurden. Die rekombinanten Fragmente aus Promotor/Signalsequenz, zu verankerndem Protein und Ankersequenz wurden dann in das stabilisierte Shuttleplasmid pSP0 umklont und nach Elektroporation in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  stabil zur Expression gebracht.



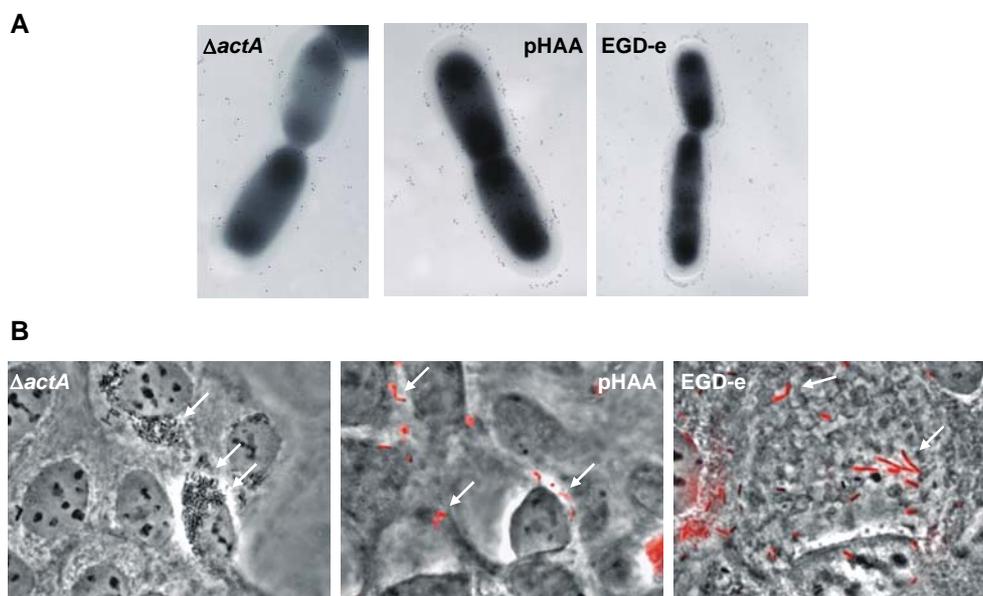
**Abbildung 5.1:** Übersicht über die Konstrukte zur Expression und Zellwandverankerung von heterologen Proteinen in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$ . Zur Klonierungsstrategie siehe Abbildung 4.4. Als Testproteine dienen ein je 234 Aminosäuren langer Abschnitt des ActA-Proteins aus *L. monocytogenes* bzw. von GFP sowie ein 241 Aminosäuren langer Abschnitt des Ovalbumins, welcher das MHC-I-Epitop SIINFEKL enthält.

Abkürzungen: SP: Signalpeptid, LRR: *leucine rich repeat*, CW: Zellwandbereich, A: Ankermotiv, M: Membranbereich.

### 5.1.1 Heterologe Verankerung von ActA in der Zellwand von *L. monocytogenes*

Um zu testen, ob sich prinzipiell auch andere Proteine als InIA über den InIA-Anker kovalent mit dem Peptidoglykan der Zellwand verknüpfen lassen, wurde ein 234 Aminosäuren umfassender Teilbereich des ActA-Proteins mit dem Ankerbereich von InIA sowie dem Promotor des *hly*-Gens samt dem dazugehörigen Sekretionssignal genetisch fusioniert und über das resultierende Plasmid pHAA in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  als Fusionsprotein zur Expression gebracht (Abbildung 5.1). Wie in der elektronenmikroskopischen Immunogoldfärbung zu erkennen ist (Abbildung 5.2 A), lagern sich die Goldkörner im Stamm BK, welcher das Plasmid pHAA trägt, ähnlich wie in *L. monocytogenes* EGD-e bandförmig um das Bakterium herum an. In Gegensatz dazu kann man im Falle der als Negativkontrolle verwendeten *actA*-Deletionsmutante *L. monocytogenes* WL-142 keine derartigen Ablagerungen um die Zelle erkennen.

Zum Nachweis einer Oberflächenexpression von ActA auch im Zytoplasma von Wirtszellen wurden Caco-2-Epithelzellen mit Stamm BK sowie den Kontrollstämmen *L. monocytogenes* EGD-e und *L. monocytogenes* WL-142 infiziert und 4 h nach Infektion mit MOI10 das oberflächenverankerte ActA mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Wie in Abbildung 5.2 B zu sehen ist, exprimieren nicht nur Bakterien in der spätlogarithmischen Wachstumsphase, sondern auch intrazellulär lokalisierte Bakterien nach Invasion von Wirtszellen heterolog verankertes ActA auf ihrer Oberfläche.



**Abbildung 5.2:** Nachweis der Oberflächenlokalisation von ActA nach heterologer Verankerung über den InIA-Anker in Plasmid pHAA.

(A) Immunogoldfärbung einer *actA*-Deletionsmutante (*L. monocytogenes* WL-142) ( $\Delta actA$ ) sowie von Wildtypbakterien (*L. monocytogenes* EGD-e) (EGD-e) und von Stamm BK, welcher das Plasmid pHAA trägt (pHAA).

(B) Immunfluoreszenzfärbung von ActA auf der Oberfläche intrazellulärer Bakterien wie in (A) 4 h nach Infektion von Caco-2-Zellen mit MOI10. Pfeile: Intrazelluläre Bakterien.

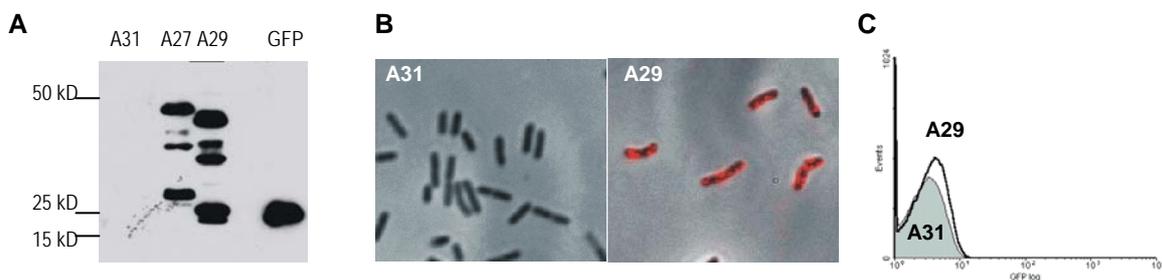
Als Erstantikörper diente  $\alpha$ -ActA-pAK, als Zweitantikörper in (A) Maus  $\alpha$ -Kaninchen pAK-12 nm Gold und in (B) Ziege  $\alpha$ -Kaninchen pAK-Rhodamine Red™, jeweils in der in Tabelle 3.14 angegebenen Verdünnung.

### 5.1.2 Verankerung von GFP

Um zu testen, ob auch eukaryontische nicht genuin membranassoziierte Proteine über den InIA-Anker in der Zellwand von *L. monocytogenes* in einer funktionell aktiven Form verankert werden können, wurde GFP als Testprotein verwendet (Abbildung 5.1). Zum Nachweis der Zellwandverankerung wurden die Stämme A27 und A29 in der spätlogarithmischen Wachstumsphase geerntet und dann die Proteine der Zellwand isoliert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte mittels Westernblot mit einem für GFP-spezifischen polyklonalen Antikörper. Als Negativkontrolle wurde Stamm A31 verwendet, welcher das Ausgangsplasmid pSP0 trägt und als Positivkontrolle ein Proteinschnellysat aus GFP-exprimierenden *E. coli*-Zellen (G. Gerlach).

Wie in Abbildung 5.3 A zu erkennen, kommt es im Gegensatz zur Negativkontrolle A31 sowohl in Stamm A27 als auch in Stamm A29 zur Expression von GFP. Diese ist im Stamm A29, in welchem die Expression von Plasmid pHGA unter der Kontrolle des extrazellulär stark aktivierten *hly*-Promotor stattfindet, stärker als in Stamm A27, in dem die GFP-Expression von Plasmid pAGA von dem extrazellulär sehr viel schwächer aktivierten *actA*-Promotor gesteuert wird. Auffallend ist, dass in beiden Fällen neben einer Bande von der zu erwartenden Größe auch zahlreiche, höhermolekulare Nebenbanden auftreten. Da in der Negativkontrolle keinerlei Banden zu sehen sind, dürfte es sich hierbei nicht um unspezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers mit Zellwandbestandteilen von *L. monocytogenes* handeln. Möglicherweise liegt GFP daher zum Teil noch als nicht prozessiertes Fusionsprotein vor bzw. gebunden an Zellwandbestandteile.

Auch über eine Immunfluoreszenzfärbung konnte eine GFP-Expression auf der Oberfläche von Stamm A29 in der spätlogarithmischen Wachstumsphase gezeigt werden (Abbildung 5.3 B). Allerdings scheint das GFP nicht in einer funktionellen, d. h. fluoreszierenden Form vorzuliegen, wie die flusszytometrische Analyse der GFP-Fluoreszenz von Stamm A31 und Stamm A29 in der spätlogarithmischen Wachstumsphase zeigt (Abbildung 5.3 C).



**Abbildung 5.3:** Verankerung von GFP in der Zellwand von Bakterien der spätlogarithmischen Wachstumsphase nach Anzucht in BHI.

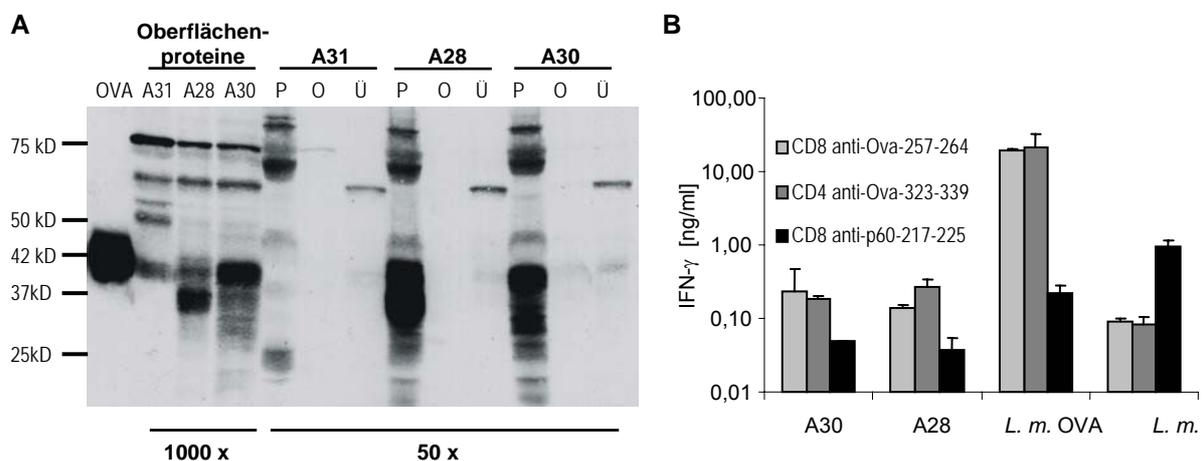
(A) Nachweis der GFP-Verankerung in der Zellwand der Stämme A27 und A29 durch Westernblot. Erstantikörper Kaninchen  $\alpha$ -GFP-pAk (1:5000), Zweitantikörper Maus  $\alpha$ -Kaninchen-Peroxidase (1:5000). Ein Proteinschnellysat aus GFP-exprimierenden *E. coli*-Zellen diente als Positivkontrolle, Stamm A31 als Negativkontrolle.

(B) Immunfluoreszenzfärbung von oberflächenverankertem GFP. Erstantikörper Kaninchen  $\alpha$ -GFP-pAk (1:5000), Zweitantikörper Ziege  $\alpha$ -Kaninchen-Rhodamine Red™ (1:500).

(C) Flusszytometrische Analyse der GFP-Fluoreszenz in den Stämmen A31 und A29 bei 515 nm nach Anregung bei 488 nm mit einem Argonionenlaser.

### 5.1.3 Verankerung von Ovalbumin in der Zellwand von *L. monocytogenes*

Da für Ovalbumin ein etabliertes Testsystem für die *in vitro*-Antigenpräsentation eines CD8- und CD4-Epitops zur Verfügung stand [108], wurde dieses mit Hilfe der beiden Vektoren pAOA und pHOA in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  exprimiert. Wie im Westernblot mit Hilfe eines ovalbuminspezifischen polyklonalen Antikörpers in Abbildung 5.4 A zu erkennen ist, konnte die Oberflächenverankerung in der Aufarbeitung von Oberflächenproteinen bei entsprechender Ankonzentration sowohl in Stamm A28, der das Plasmid pAOA trägt, als auch in Stamm A30, der das Plasmid pHOA beherbergt, nachgewiesen werden. Allerdings zeigen sich auch hier in dem als Negativkontrolle verwendeten Stamm A31 zahlreiche unspezifische Banden. In der Aufarbeitung der Zellpellets, welche vor allem aus zytosolischen Proteinen bestehen, ist nur in den Stämmen A28 und A30, nicht aber in Stamm A31 eine Expression von Ovalbumin nachweisbar. Auffallend ist ferner, dass in der Fraktion der Oberflächenproteine der Stämme A28 und A30 die mit dem ovalbuminspezifischen polyklonalen Antikörper reagierenden spezifischen Banden auf unterschiedlicher Höhe laufen, wo hingegen in der Fraktion der Pelletproteine die spezifischen Banden auf der gleichen Höhe liegen. Eine Sekretion von nichtverankertem Ovalbumin in den Überstand konnte nicht nachgewiesen werden. Obwohl somit eine Antigensynthese in den Stämmen A28 und A30 nachweisbar war, konnte nach Infektion von murinen BMM $\Phi$  mit beiden Stämmen weder eine Präsentation des CD4-Epitops OVA<sub>257-264</sub> noch eine des CD8-Epitops OVA<sub>323-339</sub> nachgewiesen werden (Abbildung 5.4 B). Im Gegensatz dazu war nach Infektion von M $\Phi$  mit einem Listerienstamm, der eine Kopie des *ova*-Gens unter der Kontrolle des *hly*-Promotors im Chromosom trägt und somit Ovalbumin in den Extrazellularraum sezerniert [300], eine Präsentation von Ovalbuminepitopen nachweisbar.



**Abbildung 5.4:** Expression und Verankerung von Ovalbumin in der Zellwand von Bakterien der spätlogarithmischen Wachstumsphase nach Anzucht in BHI.

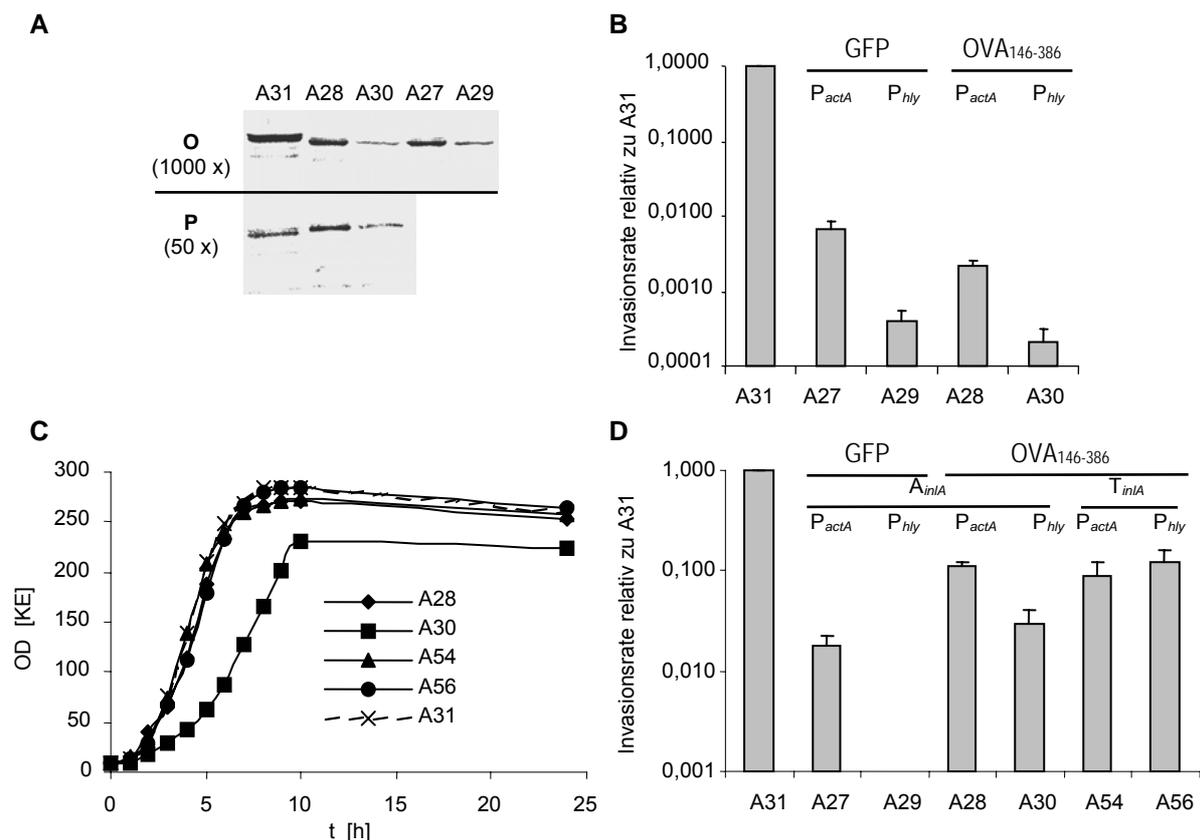
(A) Nachweis der Ovalbuminexpression mittels Westernblot von Zellpellet-, Oberflächen- und Überstandsproteinen der Stämme A28, A30 und A31. Gereinigtes Ovalbumin diente als Positivkontrolle (Kaninchen  $\alpha$ -OVA-pAk (1:5000)). Die Oberflächenproteine waren 1000fach angereichert. Zum Vergleich der Expression in verschiedenen Kompartimenten erfolgte ferner eine Anreicherung der Pellet (P)-, Oberflächen (O)- und Überstandsproteine (Ü) um den Faktor 50.

(B) Präsentation der Ovalbuminepitope Ova<sub>257-264</sub> (CD8) und Ova<sub>323-339</sub> (CD4) sowie eines CD8-Epitops des listeriellen Oberflächenproteins P60 6 h nach Infektion von primären Knochenmarksmakrophagen aus CB6-Mäusen bei MOI10 mit den Stämmen A28 und A30. Zur Messung der ovalbuminspezifischen Antigenpräsentation diente der ovalbuminsezernierende Stamm *L. monocytogenes* OVA als Positivkontrolle und der Wildtypstamm *L. monocytogenes* EGD-e als Negativkontrolle. Aufgetragen ist die in den Überstand freigesetzte Menge an IFN- $\gamma$  aus aktivierten CD4- bzw. CD8-T-Zellen.

Vergleicht man die Präsentation eines CD8-Epitops aus dem listeriellen Oberflächenprotein P60, so ist diese zwar in allen drei ovalbuminexprimierenden Stämmen im Vergleich zum Wildtyp *L. monocytogenes* EGD-e reduziert, jedoch ist diese Reduktion bei den beiden Stämmen A28 und A30 besonders ausgeprägt.

#### 5.1.4 Einfluss der Verankerung auf die Vitalität und Virulenz der Trägerstämme

Wie im Westernblot mit einem polyklonalen und InIA-spezifischen Antikörper zu erkennen (Abbildung 5.5 A), kommt es durch die Expression und Zellwandverankerung heterologer Proteine und in Abhängigkeit von der Expressionsstärke zu einer herabgesetzten Expression von InIA in den entsprechenden Trägerstämmen. Entsprechend ist auch die Invasion von Caco-2-Epithelzellen (Abbildung 5.5 B) wie auch die von P388.D1-Makrophagen (Abbildung 5.5 D) je nach exprimierten Antigen und in Abhängigkeit von dessen Expressionsstärke im Vergleich zum Kontrollstamm A31 um das bis zu Tausendfache herabgesetzt. Um zu testen, ob allein schon die Expression eines heterologen Proteins oder erst die Zellwandverankerung die wesentliche metabolische Belastung für die entsprechenden Bakterienstämme darstellt, wurden die Plasmide pAOT und pHOT konstruiert und in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  eingeführt (Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.5:** Einfluss der Expression und Zellwandverankerung heterologer Proteine auf die Invasivität und Fitness von *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$ .

(A) Expression von InIA im Gesamtzellextrakt (P) und Oberflächenfraktion (O) in den angegebenen Trägerstämmen (A28, A30, A27 und A29) bzw. der Negativkontrolle A31 in der spätlogarithmischen Wachstumsphase nach Anzucht in BHI. Erstantikörper: Kaninchen  $\alpha$ -Internalin A (1:2000), Zweitantikörper Ziege  $\alpha$ -Kaninchen-Peroxidase (1:5000).

(B) Invasion von Caco-2-Zellen mit MOI10 relativ zu Stamm A31.

(C) Wachstum der einzelnen Trägerstämme in BHI.

(D) Invasion von P388.D1-M $\Phi$  bei MOI1 relativ zu Stamm A31.

Wie mittels Westernblot überprüft wurde (ohne Abbildung), kommt es in den entsprechenden Trägerstämmen A54 (enthält Plasmid pAOT) und A56 (enthält Plasmid pHOT) zwar zu einer Expression von Ovalbumin, doch wird dieses wie erwartet in den Überstand sezerniert und nicht wie in den entsprechenden Stämmen A28 bzw. A30 in der Zellwand verankert. Wie in Abbildung 5.5 C zu erkennen ist, kommt es selbst bei Expression von sezerniertem OVA unter dem auch in BHI stark aktiven Promotor  $P_{hly}$  (Stamm A56) zu keiner Herabsetzung der Wachstumsgeschwindigkeit. Hingegen ist diese bei Stamm A30 drastisch reduziert (Expression von zellwandverankertem Ovalbumin unter der Kontrolle von  $P_{hly}$ ). Ähnlich den Stämmen A28 und A30 zeigen allerdings auch die Stämme A54 und A56 im Vergleich zu Stamm A31 in P388.D1-M $\Phi$  eine Reduktion ihrer Invasivität, wenn auch nicht in Abhängigkeit von der Stärke der Expression des Reportergens (Abbildung 5.5 D).

### 5.1.5 Zusammenfassung

Die experimentellen Ergebnisse des Abschnitts 5.1 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Über das LPXTG-Ankermotiv von Internalin können heterologe Proteine in der Zellwand von *L. monocytogenes* verankert werden.
2. Die Verankerung eines Proteins erfolgt mitunter jedoch nicht in seiner funktionell aktiven Form.
3. Eine starke Expression sowie die Verankerung einer großen Zahl heterologer Fremdproteine führt zu einer herabgesetzten Expression von InIA sowie zu einer geringeren Invasivität der Bakterien auch in phagozytischen Zellen.
4. Der Aufbau der Zellwand wird möglicherweise durch den massiven Einbau von Fremdproteinen gestört und damit die Fitness und Virulenz der Bakterien herabgesetzt.

## 5.2 Untersuchungen zur bakteriellen Übertragung eukaryontischer Expressionsplasmide auf Säugerzellen mittels *L. monocytogenes*

### 5.2.1 Bestimmung von Stabilität und Kopienzahl der Plasmide pFLO1, pMK4 und pUNK1

Die Bestimmung der Kopienzahl von pUNK1, pFLO1 und pMK4 erfolgte anhand ihrer jeweils stabilisierten Varianten pSP0, pTRPS und pMK4-TRPS in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  über die Bestimmung der Kopienzahl der *trpS*-Gens mittels *Real-Time*-PCR wie in Abschnitt 4.1.8 beschrieben. Zur Kalibrierung diente einerseits eine Konzentrationsreihe des Plasmids pSP0. Andererseits diente auch die chromosomale Kopie des *trpS*-Gens in *L. monocytogenes* in einem parallelen Ansatz als interne Kontrolle. So ergaben sich die in Tabelle 5.1 wiedergegebenen Werte.

Um auch Aussagen über die Stabilität der Plasmide in *L. monocytogenes* zu erhalten, wurden Bakterien mit den Plasmiden pFLO1, pUNK1 und pMK4 mittels Elektroporation transformiert und Transformanten nach Einzelklonisierung über Nacht ohne entsprechendes Antibiotikum in BHI kultiviert. Es ergaben sich die in Tabelle 5.1 angegebenen Werte. Plasmid pUNK1 hatte dabei die geringste Kopienzahl und die höchste Plasmidstabilität, Plasmid pMK4 umgekehrt die höchste Kopienzahl und die niedrigste Stabilität.

Tabelle 5.1: Übersicht über die Ergebnisse der Kopienzahlbestimmung und Stabilität der verwendeten Ausgangsplasmide.

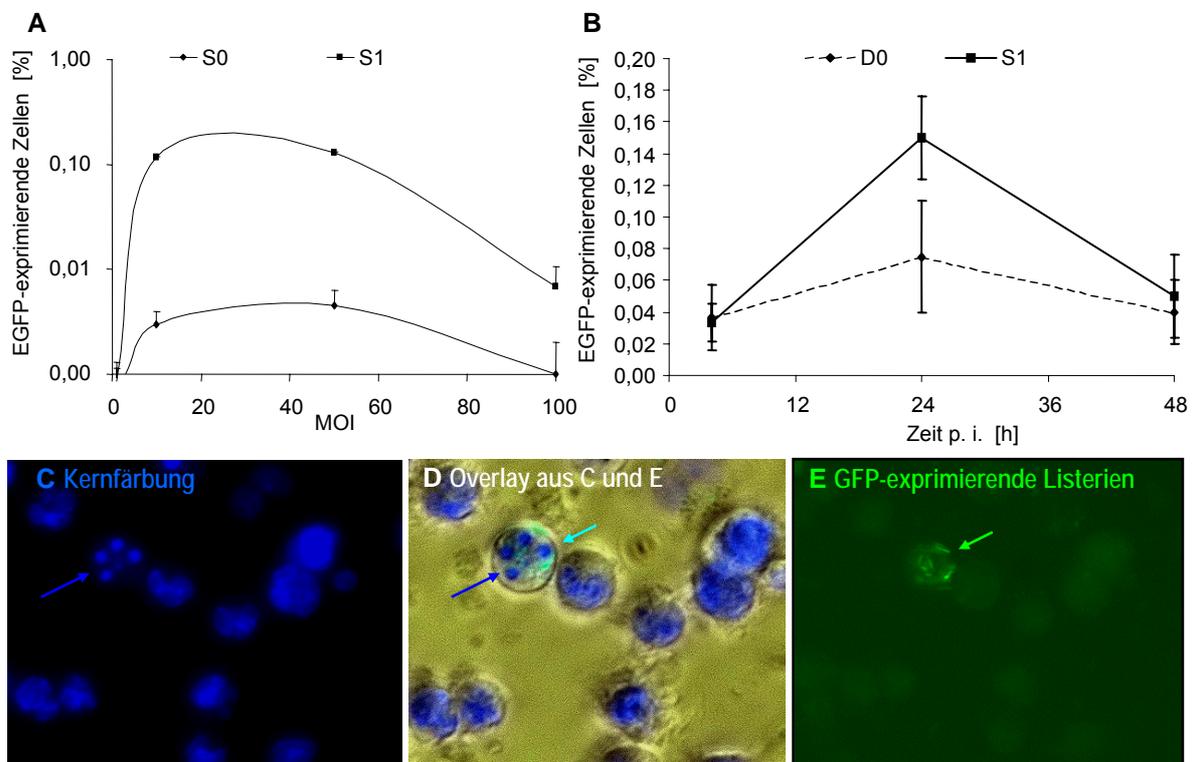
	pFLO1	pMK4	pUNK1
grampositiver Replikationsursprung	pBC16	pCI194	pAM $\beta$ 1
Kopienzahl der stabilisierten Versionen in <i>L. monocytogenes</i> $\Delta trpS$	75 $\pm$ 36	162 $\pm$ 36	29 $\pm$ 5
Prozentzahl plasmidtragender Listerien nach 24 h Kultur in BHI ohne Antibiotikum	41 $\pm$ 6	6 $\pm$ 3	97 $\pm$ 6

### 5.2.2 Baktinfektion von dendritischen Zellen

Um die Effektivität der Antigenexpression in primären dendritischen Zellen nach Baktinfektion zu messen, wurden BMDC aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen sowie hmoDC aus dem peripheren Blut präpariert. Diese sowie FSDC wurden dann mit verschiedenen Listerienstämmen infiziert, welche jeweils ein EGFP-codierendes Plasmid für die Expression durch die eukaryontische Zelle tragen. Nach Infektion konnte somit der Anteil erfolgreich transformierter Zellen anhand des Prozentsatzes EGFP-exprimierender Wirtszellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Flusszytometrie bestimmt werden.

Wie in Abbildung 5.6 A, B und G zu erkennen, lassen sich DC prinzipiell mittels Baktinfektion transformieren, wenn auch der Anteil transformierter Zellen dabei generell unter 1% lag. Die höchste Anzahl an EGFP-exprimierenden FSDC wurde 24 h nach Infektion bei Verwendung einer MOI zwischen 10 und 50 erhalten. Bei höheren MOI und zu späteren Zeitpunkten sankt die Transformationsrate wieder ab. Wie auch bei epithelialen Zellen führte die Expression des

Phagenlysins Ply118 durch den Stamm S1 im Zytoplasma der Wirtszellen 24 h p. i. zu einer 10-fachen Erhöhung des Anteils transformierter Zellen gegenüber dem Kontrollstamm S0 (Abbildung 5.6 A). Allerdings waren innerhalb der ersten 12 h nach Infektion weder fluoreszenzmikroskopisch noch flusszytometrisch eine signifikante Anzahl EGFP-exprimierender FSDC nachweisbar (Abbildung 5.6 B). Im Gegensatz dazu waren aber bereits 4 h nach Infektion mit dem GFP-exprimierenden Stamm GD in infizierten BMDC der Maus mikroskopisch apoptotische Kernveränderungen feststellbar (Abbildung 5.6 C bis D). Auch in diesen Zellen konnte erst 24 h nach Infektion mit dem Stamm S1 bei MOI10 fluoreszenzmikroskopisch eine EGFP-Expression in  $\leq 1 \times 10^5$  Zellen nachgewiesen werden. Die Ausbeute an transformierten Zellen 24 h p. i. lag mit 0.1 % in primären hmoDC über der in primären murinen Zellen.



**Abbildung 5.6:** Infektion dendritischer Zellen aus Maus (A-E) und Mensch (F und G) mit *L. monocytogenes*.

(A) Abhängigkeit des Anteils transformierter FSDC 24 h nach Infektion mit Stamm S0 und dem isogenen Ply118-exprimierenden Stamm S1 von der MOI. (B) Kinetik der EGFP-Expression in FSDC nach Infektion mit Stamm S1 sowie der Negativkontrolle D0 bei MOI 50. (C) bis (E) Zytotoxische Effekte in primären BMDC 4 h nach Infektion mit dem GFP-exprimierenden Stamm GD

(MOI1). In (C) weist der Pfeil auf typische apoptotische Kernveränderungen in der infizierten Zelle nach Kernfärbung mit Bisbenzimid hin, in (D) auf die fluoreszierenden intrazellulären Bakterien. (D) ist eine Überlagerung aus (C) und (E).

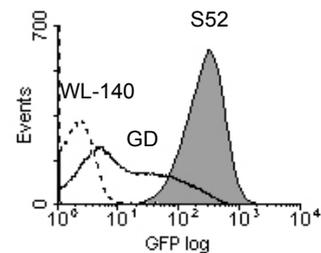
(F) und (G) zeigen die EGFP-Expression in humanen moDC 24 h nach Infektion mit Stamm D0 (MOI10) (F) und S1 (G).

### 5.2.3 Abschätzung der Effizienz der bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA in verschiedenen Zelltypen

Zur weiteren quantitativen Abschätzung der Effizienz der bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA in nicht-professionell wie auch in professionell phagozytischen Zellen wurde in parallelen Ansätzen sowohl die Anzahl infizierter Zellen als auch die Anzahl transformierter Zellen nach Infektion mit verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämmen gemessen.

Dazu wurde zunächst das GFP-Expressionsplasmid pCSA4 konstruiert (Abbildung 4.3). Aufgrund der Stabilisierung ist die Rate an Bakterienzellen, die kein GFP produzieren, im Falle der Stämme S52 bzw. S54 sehr viel niedriger als im Vergleich zu Stamm GD, der das nicht-stabilisierte Plasmid pLSV16- $P_{actA}$ -*gfp* enthält (Abbildung 5.7). Auch war die mittlere GFP-Expression pro Bakterienzelle im Falle von Stamm S52 größer als im Falle von Stamm GD. Somit konnte der Anteil infizierter Wirtszellen flusszytometrisch durch Infektion der eukaryontischen Wirtszellen mit den GFP-exprimierenden Stämmen S52 bzw. S54 annähernd quantitativ bestimmt werden.

**Abbildung 5.7:** GFP-Expression in Bakterienzellen der Stämme S52 und GD in der spätlogarithmischen Wachstumsphase nach Anzucht in BHI. Stamm WL-140 diente als Negativkontrolle.



Zur Bestimmung des Anteils transformierter, d. h. EGFP-exprimierender eukaryontischer Zellen  $T_i(t)$  nach Infektion mit dem Listerienstamm  $i$  und der Zeit  $t$  wurden die in Tabelle 5.2 angegebenen Zelllinien mit den Stämmen S1 und S70 mit MOI50 infiziert und der Anteil fluoreszierender Zellen 4 h und 48 h nach Infektion flusszytometrisch bestimmt. Im Gegensatz zu Stamm S1 ist der Stamm S70 aufgrund einer chromosomalen Deletion des *actA*-Gens nicht in der Lage, sich mittels Spreading von Zelle zu Zelle auszubreiten, wodurch zusätzlich der Einfluss des Spreadings auf die Transformationseffizienz untersucht werden sollte. Zur Abschätzung des Anteils infizierter Wirtszellen  $I_i(t)$  wurden diese in parallelen Ansätzen unter identischen Bedingungen mit dem zu S70 isogenen aber GFP-exprimierenden Stamm S54 infiziert und der Anteil fluoreszierender Wirtszellen 4 h nach Infektion durchflusszytometrisch bestimmt. Als Schätzer für die Transformationseffizienz  $\eta_i(t)$  wurde der Quotient aus den transformierten Zellen  $T_i(4h)$  bzw.  $T_i(48h)$  relativ zu den infizierten Zellen  $I_{S54}(4h)$  wie folgt gebildet:

$$\eta_{S1}(4h) = \frac{T_{S1}(4h)}{I_{S54}(4h)} \text{ und } \eta_i(48h) = \frac{T_i(48h)}{I_{S54}(4h)} \text{ mit } i \in \{S1; S70\}.$$

Außerdem wurde mittels eines MTT-Tests auch die relative Anzahl vitaler Zellen  $V_i(t)$  nach Infektion mit dem Listerienstamm  $i$  und der Zeit  $t$  gemessen. Das Produkt aus  $T_{S1}(48h)$  und  $V_{S1}(48h)$  diente als Schätzer für die relative Anzahl transformierter und vitaler Zellen  $\beta$ . Das Ergebnis dieser Messungen zeigt Tabelle 5.2.

Tabelle 5.2: Abschätzung der Transformationseffizienz nach Baktofektion verschiedener Zelltypen.

	Nichtprofessionelle Phagozyten		Phagozytische Zellen	
	Caco-2	HepG2	P388.D1	FSDC
<b>1. Abschätzung der Transformationseffizienz</b>				
Infizierte Zellen $I_{S54}(t)$ [%]				
4 h p. i.	9.72 ± 0.50	0.45 ± 0.10	21.5 ± 1.2	43.2 ± 3.0
Transformierte Zellen $T_i(t)$ [%]				
- S1 ( <i>actA</i> <sup>+</sup> )				
4 h p. i.	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.01 ± 0.01
48 h p. i.	2.69 ± 0.19	3.76 ± 0.15	3.26 ± 0.51	0.31 ± 0.08
- S70 ( <i>actA</i> )				
48 h p. i.	0.16 ± 0.01	n. d.	0.10 ± 0.01	n. d.
Transformationseffizienz $\eta_i(t)$ [%]				
4 h p. i.	0.21 ± 0.21	4.44 ± 2.41	0.28 ± 0.09	0.02 ± 0.02
48 h p. i.	1.65 ± 0.13	n.d.	0.47 ± 0.05	n. d.
<b>2. Abschätzung der Zahl vitaler transformierter Zellen</b>				
Vitale Zellen $V_i(t)$ [%]				
48 h p. i.	62 ± 4	127 ± 25	27 ± 2	58 ± 4
Vitale transformierte Zellen $\beta$ [%]				
48 h p. i.	1.7 ± 0.2	4.8 ± 1.0	0.9 ± 0.2	0.2 ± 0.1

Obwohl die Infektionsraten  $I_{S54}(4h)$  bei P388.D1-M $\Phi$  und FSDC erwartungsgemäß um den Faktor 2-100 über den der nichtprofessionell phagozytischen Zellen Caco-2 und HepG2 lagen, war die Anzahl transformierter Zellen  $T_i(48h)$  bei den nichtprofessionellen Phagozyten vergleichbar mit der nach Infektion von phagozytischen Zellen. Zusammen ergibt sich daraus eine im Mittel deutlich niedrigere Transformationseffizienz der phagozytischen Zellen. Auch waren diese anfälliger gegenüber den zytotoxischen Effekten des verwendeten Trägerstammes S1 als nichtprofessionelle Phagozyten, so dass auch die Anzahl vitaler transformierter Zellen bei den phagozytischen Zellen deutlich niedriger ausfiel. Aufgrund des Spreadingdefekts war der Prozentsatz transformierter Zellen 48 h nach Infektion mit Stamm S70 deutlich geringer als nach Infektion mit Stamm S1.

#### 5.2.4 Mikroinjektion von Bakterien und Plasmid in das Zytoplasma von Caco-2-Zellen

Die Mikroinjektion von Bakterien direkt in das Zytoplasma von Wirtszellen diente zur weiteren Klärung der Frage, ob das Phagenlysin Ply118 tatsächlich erst im Zytoplasma der infizierten Zelle wirkt oder ob es schon vorher im Phagosom exprimiert wird und dort bereits die Bakterien lysiert. Ähnlich der Situation bei der Übertragung von Plasmid-DNA durch *S. typhimurium* [62] würde dabei zunächst DNA aus den Bakterien in das Phagosom freigesetzt und von dort in das Zytoplasma der Zelle gelangen. Da professionelle Phagozyten wie P388.D1-M $\Phi$  und FSDC aufgrund ihrer Größe und Beschaffenheit für eine intrazytoplasmatische Mikroinjektion nicht geeignet waren, wurden für diese Versuche ausschließlich Caco-2-Epithelzellen verwendet. Ferner sollte geklärt werden, welchen Einfluss das Spreading auf die Transformationseffizienz hat und durch Vergleich mit der intrazytoplasmatischen Mikroinjektion von Plasmid-DNA, wie viel DNA dabei in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangen muss, um diese zu transformieren. Da hochmolekulares Dextran mit einem Molekulargewicht über 70 kDa nicht die Kernporen passieren kann, kann es somit auch nicht aus dem Zytoplasma in den Kern mitotisch inaktiver Zellen gelangen. Somit konnte die korrekte Lokalisation der Mikroinjektion in das Zytoplasma der Epithelzelle durch Koinjektion von mit Texas Red-gekoppelten hochmolekularen Dextran (MW 70 kDa) überprüft werden.

Wie in Abbildung 5.8 A zu erkennen, erscheinen primär injizierte Caco-2-Zellen aufgrund der Texas Red-Fluoreszenz rot und EGFP-exprimierende Zellen aufgrund der Überlagerung der roten Texas Red-Fluoreszenz mit der grünen EGFP-Fluoreszenz gelb. Solche Zellen, in die die Bakterien durch Spreading aus benachbarten Zellen gelangt sind und die durch die Freisetzung von Plasmid-DNA aus den Trägerbakterien transformiert wurden, erscheinen aufgrund der EGFP-Fluoreszenz grün (Abbildung 5.8 B). Pro Stamm bzw. Plasmid wurden mindestens 100 Zellen injiziert. Wie weiter in Abbildung 5.8 C zu erkennen, exprimieren 5,3% der mit dem  $\Delta actA$ -Stamm S71 injizierten Zellen 24 h nach Injektion EGFP. Im Gegensatz dazu waren es 13,4% aller Zellen, die mit dem Ply118-exprimierenden Stamm S70 injiziert wurden. Im Falle der spreadingkompetenten Stämme waren es 0,3% nach Injektion von S0 bzw. 9,2% nach Injektion von S1. Im Gegensatz zu den spreadingdefekten Mutanten S70 und S71 kam es nach Injektion von S0 bzw. S1 mit zunehmender Zeit nach Injektion auch zu einem weiteren Anstieg der Anzahl EGFP-exprimierender Zellen. Bemerkenswerterweise waren es hierbei aber nicht die primär injizierten Zellen, die EGFP produzierten, sondern Zellen in der Nachbarschaft von primär injizierten Zellen (Abbildung 5.8 B). Bei Verwendung der spreadingdefizienten Stämme S70 oder S71 produzierten ausschließlich die primär injizierten Zellen EGFP (Abbildung 5.8 A). Vergleichbar mit S0 führte die intrazytoplasmatische Injektion von *S. typhimurium* ST1 ebenfalls zu 2,6% EGFP-exprimierender Zellen, wobei hier allerdings die Anzahl der EGFP-positiven Zellen im weiteren Verlauf abnahm.

Injiziert man nackte Plasmid-DNA in das Zytoplasma von Caco-2-Zellen, so ergibt sich ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der EGFP-exprimierenden Zellen und der injizierten Plasmid-Menge (Abbildung 5.8 D) [259]. Insbesondere erscheint eine gewisse Mindestanzahl an Plasmiden erforderlich, um eine Zelle erfolgreich zu transformieren. Umgekehrt sind

selbst bei Applikation sehr großer Mengen Plasmid-DNA nicht alle injizierten Zellen 24 h nach Injektion auch transformiert.

Vergleicht man die Anzahl EGFP-exprimierender Zellen 24 h nach intrazytoplasmatischer Mikroinjektion von Plasmid pSP118-EGFP (Abbildung 5.8 D) mit der nach Mikroinjektion von Stamm S1 (Abbildung 5.8 C), so erhält man 24 h nach Injektion von  $10^1$ - $10^2$  Molekülen pSP118-EGFP in etwa die gleiche Anzahl EGFP-exprimierender Zellen wie nach Injektion von Stamm S70. Nachdem die Kopienzahl von pUNK1-Derivaten bei ca. 30 pro Bakterienzelle liegt (Tabelle 5.1), bedeutet dies, dass bereits die Lyse von ca. 1-3 intrazytoplasmatischen Bakterienzellen zur Transformation der infizierten Zelle führen kann.

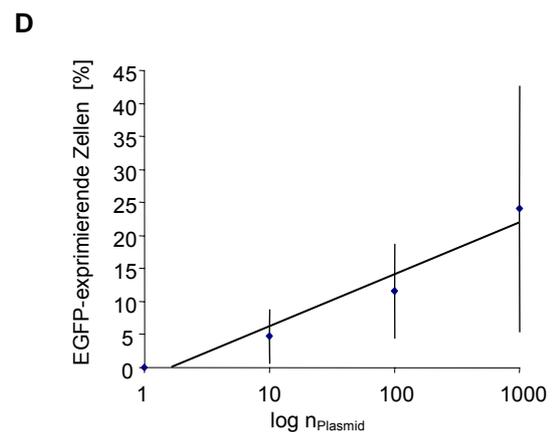
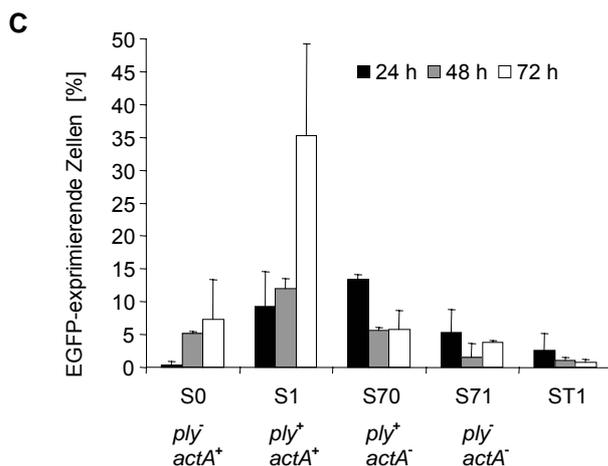
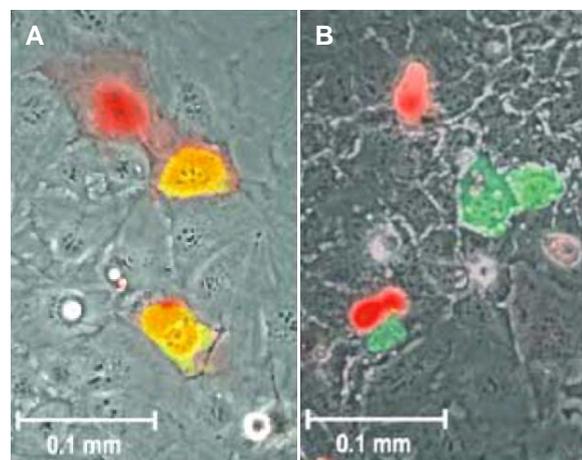
**Abbildung 5.8:** Mikroinjektion von Bakterien (A-C) und Plasmid-DNA (D) in das Zytoplasma von Caco-2-Epithelzellen.

(A) Caco-2-Zellen 24 h nach Mikroinjektion von Stamm S70. Primär injizierte Zellen erscheinen rot aufgrund des koinjizierten, Texas-Red-konjugierten Dextrans (70 kDa). EGFP-exprimierende, injizierte Zellen erscheinen gelb durch die Überlagerung der grünen EGFP-Fluoreszenz mit der roten Texas Red-Fluoreszenz.

(B) Caco-2-Zellen 24 h nach Mikroinjektion von Stamm S1. Im Gegensatz zu (A) exprimieren vor allem nicht-injizierte Zellen EGFP.

(C) Zusammenfassung der Mikroinjektionsversuche mit den angegebenen Bakterienstämmen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Injektion von jeweils mindestens 100 Zellen.

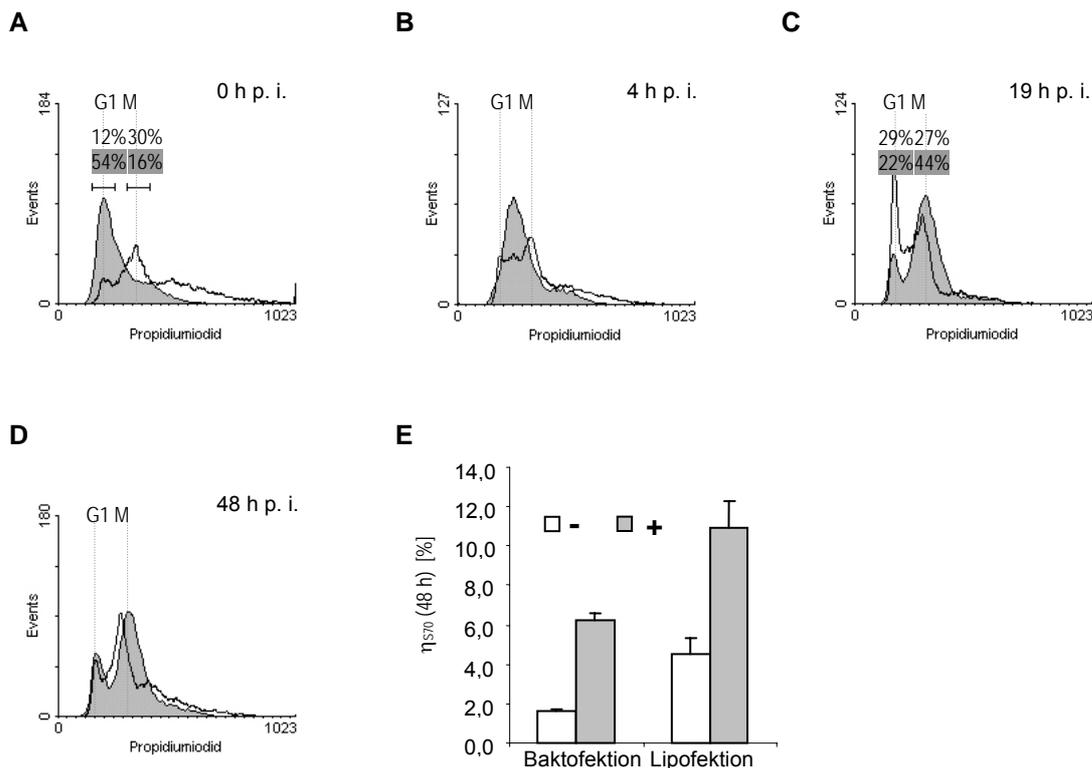
(D) Anzahl EGFP-exprimierender Caco-2-Zellen 24 h nach Injektion ansteigender Konzentrationen von Plasmid pSP118-EGFP in das Zytoplasma von Caco-2-Zellen.



### 5.2.5 Einfluss der Mitose auf die Baktofektionsraten

Um den Einfluss der Mitose auf die Transformationsrate nach Baktofektion näher zu untersuchen, wurden Caco-2-Zellen vor Infektion über 48 h in Gegenwart von 7,5 mM Thymidin inkubiert. Thymidin hemmt die Ribonukleotidreduktase [24,369] und führt dadurch zu einem Arrest des Zellzyklus in der G1/S-Phase [29,363]. Zum Zeitpunkt der Infektion wurde dann der Thymidinblock aufgehoben. Durch flusszytometrische Messung des DNA-Gehaltes der Zellen nach Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid konnten Zellen mit einfachem DNA-Gehalt von mitotischen Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt unterschieden werden.

Wie in Abbildung 5.9 zu erkennen, erhält man nach Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit Thymidin im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle eine zum Zeitpunkt der Baktofektion bzw. Lipofektion an prämitotischen Zellen angereicherte Kultur (Abbildungen 5.9 A). Wird dieser Block dann gleichzeitig mit der Baktofektion bzw. Lipofektion durch Kultivierung in thymidinfreien Medium aufgehoben, so durchläuft in der vorbehandelten Gruppe ein höherer Prozentsatz an Zellen in Gegenwart der zu transformierenden Plasmid-DNA die Mitose als in der nicht vorbehandelten Kontrolle (Abbildungen 5.9 B bis D).



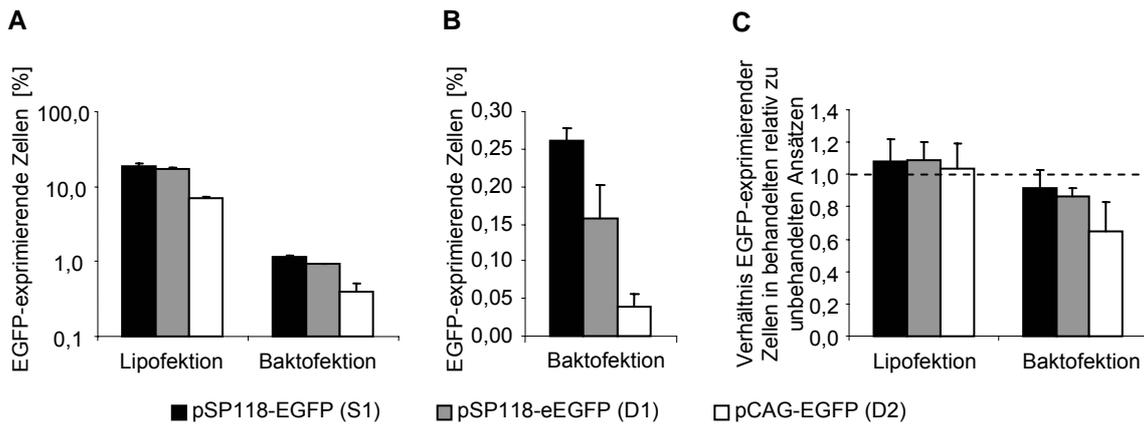
**Abbildung 5.9:** Einfluss der Mitose auf die Transformationseffizienz nach Baktofektion und Lipofektion von Caco-2-Zellen. (A) bis (D) Messung des Zellzyklus in thymidinbehandelten (grau unterlegte Kurve) und unbehandelten Zellen. Die ungefähren Prozentzahlen an Zellen in der G1- und M-Phase des Zellzyklus zu Beginn des Experiments und 19 h p. i. in thymidinbehandelten Zellen (grau unterlegt) und unbehandelter Kontrolle sind in A bzw. C angegeben. (E) Prozentsatz transformierter und infizierter Zellen 48 h nach Baktofektion mit Stamm S70 (MOI50) bzw. transformierter Zellen 48 h nach Lipofektion mit 400 ng pSP118-EGFP in thymidinbehandelten Zellen („+“) und unbehandelten Zellen („-“).

So ging die vorbehandelte Zellpopulation vier Stunden nach Infektion und damit nach Entfernen des Thymidinblocks nahezu synchron durch die S/G2-Phase und war 15 h später in der Mitose. Die unbehandelten Zellen waren dagegen weit weniger synchronisiert, und über die Zeitdauer des Experiments war auch ein geringerer Prozentsatz mitotisch. Wie außerdem in Abbildung 5.9 E zu erkennen, war im thymidinbehandelten Ansatz 48 h nach Lipofektion mit 400 ng Plasmid pSP118-EGFP ein größerer Prozentsatz transformiert als im unbehandelten Kontrollansatz. Um im Falle der Baktinfektion etwaige unterschiedliche Infektionsraten in den beiden Ansätzen zu berücksichtigen, wurde wieder wie in Abschnitt 5.2.3 zunächst der Anteil infizierter Zellen in beiden Ansätzen durch Infektion mit dem *actA*-defizienten und GFP-exprimierenden Stamm S54 abgeschätzt. Um den Einfluss des Spreadings auszuschalten, wurde parallel der Anteil EGFP-exprimierender Zellen 48 h nach Infektion mit dem ebenfalls *actA*-defizienten Stamm S70 gemessen. Der Quotient aus dem Anteil transformierter Zellen relativ zu den infizierten Zellen diente dann wieder wie in Abschnitt 5.2.1 als Schätzer für die Transformationseffizienz  $\eta_{S70}(48h)$ . Wie in Abbildung 5.9 E zu erkennen, war wie im Falle der Lipofektion auch nach Baktinfektion der Anteil EGFP-exprimierender Zellen in der vorbehandelten Zellpopulation größer als in der Kontrolle. Somit steigert wie im Falle der Lipofektion auch im Falle der Baktinfektion die Mitose die Transformationseffizienz.

### 5.2.6 Einfluss von Interferon- $\gamma$ auf die Reportergenexpression

Um eine verstärkte Expression von EGFP in der eukaryontischen Zelle zu erzielen, wurde das 72 Bp-Enhancer-A-Fragment aus SV40 (ENHA<sub>SV40</sub>) vor P<sub>CMV</sub> in Plasmid pSP118-EGFP kloniert und so Plasmid pSP118-eEGFP erzeugt. Darüber hinaus soll ENHA<sub>SV40</sub> die Aufnahme der zugehörigen Plasmid-DNA in den Zellkern auch nicht-mitotischer Zellen steigern [65,66]. Um zusätzlich noch den Einfluss von Interferon- $\gamma$  auf die Expression von EGFP unter dem CMV-Promotor *in vitro* zu untersuchen, wurden P388.D1-M $\Phi$  bei einer MOI von 10 mit den Stämmen S1, D1 und D2 infiziert und die Zellen nach Infektion in Gegenwart von 100 U/ $\mu$ l Interferon- $\gamma$  bis zum Zeitpunkt der Auswertung kultiviert [47,294]. Da die Expression unter dem  $\beta$ -Aktinpromotor nicht durch IFN- $\gamma$  beeinflusst wird [294], wurde dazu noch Plasmid pCAG-EGFP wie in Abschnitt 4.6.1 näher beschrieben konstruiert.

Im Vergleich zu Plasmid pSP118-EGFP bzw. dem dazugehörigen Trägerstamm S1 ergaben allerdings weder Plasmid pCAG-EGFP noch pSP118-eEGFP eine höhere Ausbeute an transformierten P388.D1-M $\Phi$  (Abbildung 5.10 A) bzw. FSDC (Abbildung 5.10 B) 24 h nach Infektion mit den entsprechenden Trägerstämmen D1 und D2 bzw. nach Lipofektion der entsprechenden Plasmide (Abbildung 5.10 A). Vergleicht man die Lipofektion mit der Baktinfektion hinsichtlich des Anteils transformierter Zellen *in vitro*, so ist zwar der Anteil transformierter Zellen nach Lipofektion mit 400 ng Plasmid-DNA größer als nach Baktinfektion bei MOI50 mit den korrespondierenden Trägerstämmen. Bei einer eingesetzten Masse von 400 ng Plasmid pSP118-EGFP mit einer Größe von 9958 Bp und einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  P388.D1-M $\Phi$  entspricht dies ca.  $2,4 \times 10^5$  Plasmidmolekülen pro Zelle. Bei einer Kopienzahl von ca. 30 pro Bakterienzelle entspräche dies somit einer Infektion mit ca. MOI8000. Auf die Anzahl eingesetzter Plasmidmoleküle pro Zelle bezogen ist somit die Baktinfektion *in vitro* effizienter als die Lipofektion.



**Abbildung 5.10:** Anteil EGFP-exprimierender antigenpräsentierender Zellen 24 h nach Lipofektion bzw. Baktinfektion mit Plasmid pCAG-EGFP bzw. dem zugehörigen Trägerstamm D2 im Vergleich zu den Plasmiden pSP118-EGFP und pSP118-eEGFP bzw. den Trägerstämmen S1 und D1.

(A) Prozentzahl EGFP-exprimierender P388.D1-M $\Phi$  24 h nach Lipofektion mit 400 ng Plasmid-DNA bzw. nach Baktinfektion mit den korrespondierenden Stämmen bei MOI50.

(B) Prozentzahl EGFP-exprimierender FSDC 24 h nach Baktinfektion mit MOI50.

(C) Anzahl EGFP-exprimierender P388.D1-M $\Phi$  24 h nach Baktinfektion bzw. Lipofektion in Gegenwart von 100 U/ml IFN- $\gamma$  relativ zur Anzahl EGFP-exprimierender P388.D1-M $\Phi$  in Abwesenheit von IFN- $\gamma$ .

Wie des Weiteren in Abbildung 5.10 C zu sehen ist, hatte die Gegenwart von 100 U/ml IFN- $\gamma$  im Anschluss an die Lipofektion keinen Einfluss auf die Anzahl transformierter Zellen 18 h nach Lipofektion. Hingegen war nach Baktinfektion in allen drei untersuchten Plasmiden bzw. Stämmen die Anzahl transformierter P388.D1-M $\Phi$  bei Inkubation in Gegenwart von 100 U/ml IFN- $\gamma$  nach Infektion um bis zu 30% herabgesetzt im Vergleich zu unbeeideten Kontrollen. Hinsichtlich des Einflusses von Interferon- $\gamma$  auf die Transformationseffizienz scheint somit weniger ein Unterschied zwischen den einzelnen Promotoren/Plasmiden zu bestehen als vielmehr zwischen den beiden Arten der Plasmid-Übertragung.

### 5.2.7 Zusammenfassung

Die experimentellen Ergebnisse des Abschnitts 5.2 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Spreading steigert *in vitro* die Transformationseffizienz sowohl durch die Steigerung der Anzahl infizierter Zellen als auch durch davon unabhängige Mechanismen.
2. Die Expression des Phagenlysingens setzt wie erwartet erst im Zytoplasma ein und erhöht ebenfalls die Transformationseffizienz.
3. Im Vergleich zur Lipofektion bringt die Baktinfektion mittels *L. monocytogenes* die zu übertragende Plasmid-DNA sehr viel effizienter durch das phagolysosomale Kompartiment.
4. Insbesondere in Caco-2-Zellen kann die Lyse schon eines einzelnen Bakteriums im Zytoplasma zu einer erfolgreichen Transformation der infizierten Zelle führen.
5. Wie im Falle der Lipofektion steigert auch nach Baktinfektion ein erhöhter Anteil an mitotischen Zellen in der zu transformierenden Zellpopulation die Transformationseffizienz.
6. Im Gegensatz zur Lipofektion können zwar geringe Mengen an Plasmid-DNA *in vitro* sehr effizient auf unterschiedliche Zelltypen übertragen werden, aber die zur Übertragung größerer Plasmidmengen erforderliche Erhöhung der MOI setzt aufgrund der zytotoxischen

Begleiteffekte der Trägerstämme der maximal erreichbaren Anzahl transformierter Zellen eine Obergrenze, die unterhalb der mit der Lipofektion erreichbaren Anzahl liegt.

7. Professionell phagozytische Zellen und insbesondere DC sind mittels Baktofektion deutlich schlechter transformierbar als z. B. epitheliale Zellen wie Caco-2.
8. Die Zeitspanne bis zum Einsetzen der Expression messbarer Mengen an EGFP ist deutlich länger als die bis zum Einsetzen der zytotoxischen Effekte.
9. Vermutlich über eine Aktivierung der P388.D1-M $\Phi$  und unabhängig vom verwendeten Promotor führt IFN- $\gamma$  zu einer deutlichen Verringerung der Anzahl transformierter P388.D1-M $\Phi$  nach Baktofektion mit *L. monocytogenes*.

## 5.3 Übertragung von mRNA auf Säugerzellen mittels *L. monocytogenes*

### 5.3.1 Konstruktion eines T7-Expressionssystems in *L. monocytogenes* $\Delta trpS$

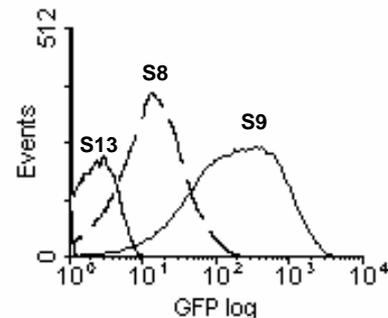
Die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 (PolT7) ist ein monomeres Enzym, welches auch lange DNA-Abschnitte bei Anwesenheit eines entsprechenden T7-Promotors *in vitro* wie auch in Bakterienzellen mit hoher Spezifität und Prozessivität sowie ohne zusätzliche Kofaktoren transkribiert [64]. Es konnte weiter gezeigt werden, dass ein derartiges T7-Expressionssystem auch in grampositiven Bakterien wie *Bacillus subtilis* [54] oder *Lactococcus lactis* [355] hoch aktiv ist. Dabei wurde die T7-RNA-Polymerase von einem Plasmid geringerer Kopienzahl codiert und das zu exprimierende Protein von einem zweiten Plasmid mit einer höheren Kopienzahl und einem spezifischen T7-Promotor codiert [355].

Daher wurden zunächst die Kopienzahlen der als Ausgangsplasmide zur Verfügung stehenden Plasmide pFLO1, pMK4 und pUNK1 über die ihrer Derivate pTRPS, pMK4-TRPS und pSP0 in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  bestimmt sowie die Stabilität von Kombinationen aus jeweils zwei Plasmiden in kotransformierten *L. monocytogenes* bei Abwesenheit eines Selektionsdruckes durch die entsprechenden Antibiotika. Die erhaltenen Werte für die Kopienzahlen sind in Tabelle 5.1 angegeben. Plasmid pUNK1 und damit auch seine Derivate pSP0 und pSP118 besitzen die niedrigste Kopienzahl und sind im Vergleich zu den beiden Plasmiden pFLO1 und pMK4 am stabilsten in *L. monocytogenes*. Plasmid pMK4 hingegen hat zwar die höchste Kopienzahl, aber dabei die geringste Stabilität. Da für alle drei getesteten Zweierkombinationen die Häufigkeit von Bakterien, die beide Plasmide enthielten, in etwa gleich dem Produkt der jeweiligen Einzelhäufigkeiten war, konnte somit bestätigt werden, dass demzufolge alle drei Plasmide zu unterschiedlichen Kompatibilitätsgruppen gehören müssen und somit die Anwesenheit eines Plasmids nicht mit der eines Zweiten interferiert. Insbesondere enthielten auch nach über 24-stündiger Inkubation in antibiotikafreiem BHI noch ca. 40% der kotransformierten *L. monocytogenes* sowohl Plasmid pUNK1 als auch Plasmid pFLO1. Bei einer Generationszeit von ca. 40 min [264] können somit beide Plasmide über ca. 40 Generationen in *L. monocytogenes* stabil koexistieren. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Plasmide pSP0 bzw. pSP118 und pFLO1 als Ausgangsplasmide für die Entwicklung eines auf zwei Plasmiden basierenden, T7-RNA-Polymerase-abhängigen Expressionssystems in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  verwendet. Die Konstruktion der Plasmide ist in Abschnitt 4.6.2 beschrieben. Im Prinzip ist das *polT7*-codierende pCSA-Plasmid als Derivat von pSP0 in *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  stabilisiert und das zweite Plasmid (pCSB) enthält das zu transkribierende Gen unter der Kontrolle eines starken T7-Promotors (Abbildung 4.3). Plasmid pCSA1 enthält als Derivat von pSP118 zusätzlich noch das Gen für das Endolysin des Bakteriophagen A118 (*ply118*) ebenfalls unter der Kontrolle von  $P_{actA}$ .

Um zu überprüfen, ob die Lokalisation des Reportergens auf dem Plasmid mit der höheren Kopienzahl und die des *polT7*-Gens auf dem mit der niedrigeren Kopienzahl auch tatsächlich zu einer maximalen GFP-Expression führt im Vergleich zu einer umgekehrten Lokalisation, wurden die beiden Plasmide pCSA5 und pCSB8 konstruiert. pCSA5 enthält das Gen für GFP unter der Kontrolle von  $P_{T7}$  und Plasmid pCSB8 das *polT7*-Gen unter der Kontrolle von  $P_{actA}$ . Stamm S9 enthält die

Plasmidkombination pCSA0 und pCSB4 und Stamm S8 die Kombination aus Plasmid pCSA5 und pCSB8. Als Negativkontrolle für die flusszytometrische Analyse der GFP-Expression in Bakterien der spätlogarithmischen Wachstumsphase nach Kultivierung in BHI diene Stamm S13, der die Plasmidkombination pCSA0 und pFLO1 enthält und somit aufgrund fehlender *gfp*-Genkopien kein GFP exprimieren kann. Wie in Abbildung 5.11 zu erkennen, zeigt Stamm S9 eine deutlich stärkere GFP-Expression als Stamm S8. Somit führt die Lokalisation des *gfp*-Gens auf einem Plasmid mit einer höheren Kopienzahl und die des *polT7*-Gens auf dem mit der niedrigeren auch in *L. monocytogenes* zu einer maximalen GFP-Expression.

**Abbildung 5.11:** Expression von GFP in *L. monocytogenes* mit Hilfe eines plasmidbasierten T7-Expressionssystems. In Stamm S8 erfolgt die PolT7-abhängige GFP-Expression von Plasmid pCSA5. In Stamm S9 erfolgt die GFP-Expression von Plasmid pCSB4, welches im Vergleich zu pCSA5 eine höhere Kopienzahl besitzt. Zur flusszytometrischen Analyse wurden die Bakterien bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase in BHI angezogen. Aufgrund eines fehlenden *gfp*-Gens diene Stamm S13 als Negativkontrolle.

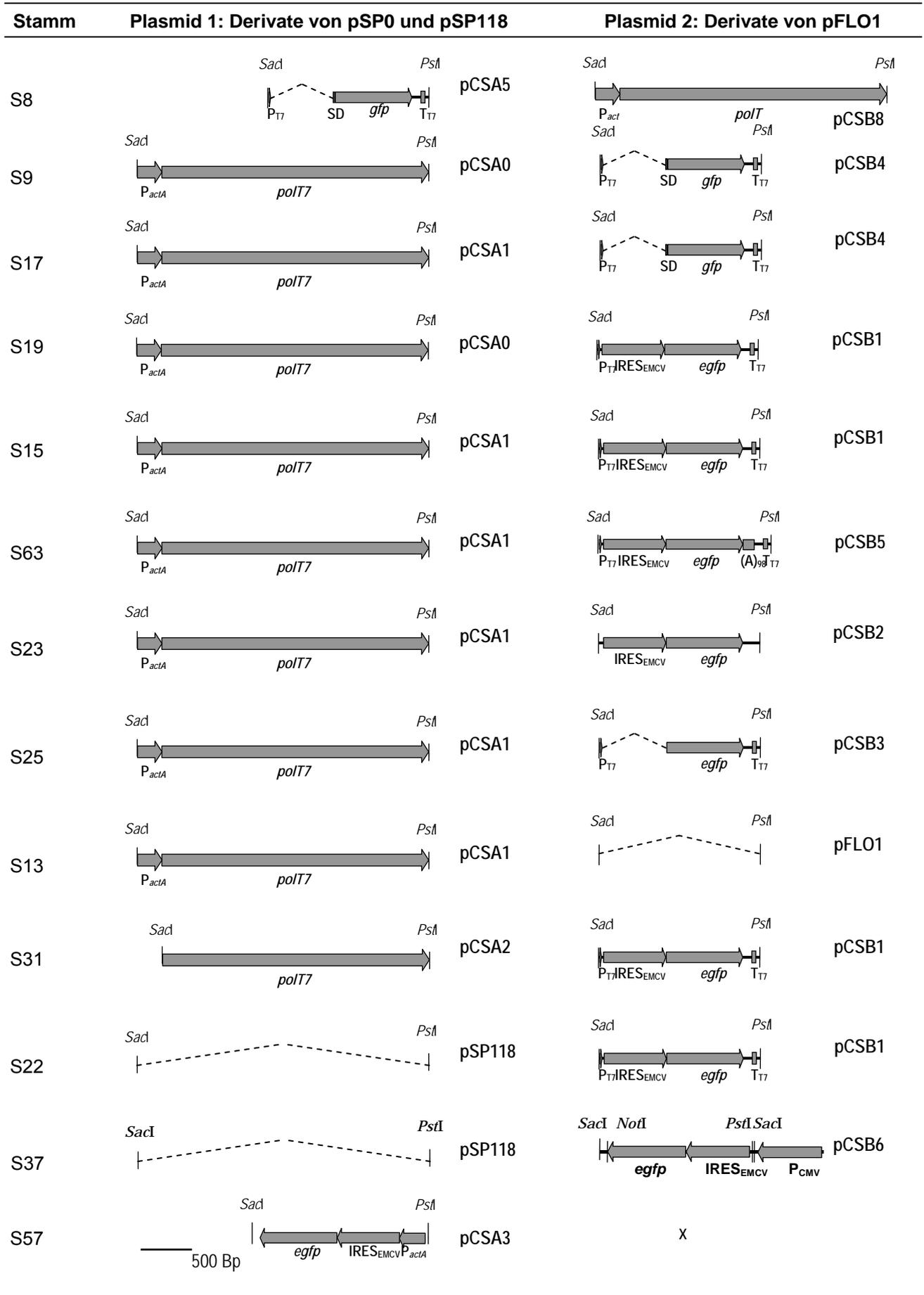


Um an Stelle einer GFP-Synthese in Bakterienzellen eine Translation des *gfp*-Transkripts in Säugerzellen zu ermöglichen, wurde in Plasmid pCSB1 die prokaryontische Ribosomenbindestelle durch die interne Ribosomenbindestelle des Encephalomyocarditisvirus (IRES<sub>EMCV</sub>) ersetzt. Das IRES<sub>EMCV</sub>-Element ermöglicht eine Translation der durch die T7-RNA-Polymerase transkribierten RNA am eukaryontischen Ribosom unabhängig von posttranskriptionellen Prozessierungsschritten der eukaryontischen Wirtszelle [17,84,153]. Ferner enthält Plasmid pCSA1 das *egfp*-Gen, welches eine Variante des *gfp*-Gens ist und aufgrund einer Codonoptimierung in Eukaryontenzellen besser exprimiert und mittels Durchflusszytometrie schon bei einer geringen Expression nachgewiesen werden kann [375].

### 5.3.2 Charakterisierung der Stämme zur Übertragung von RNA

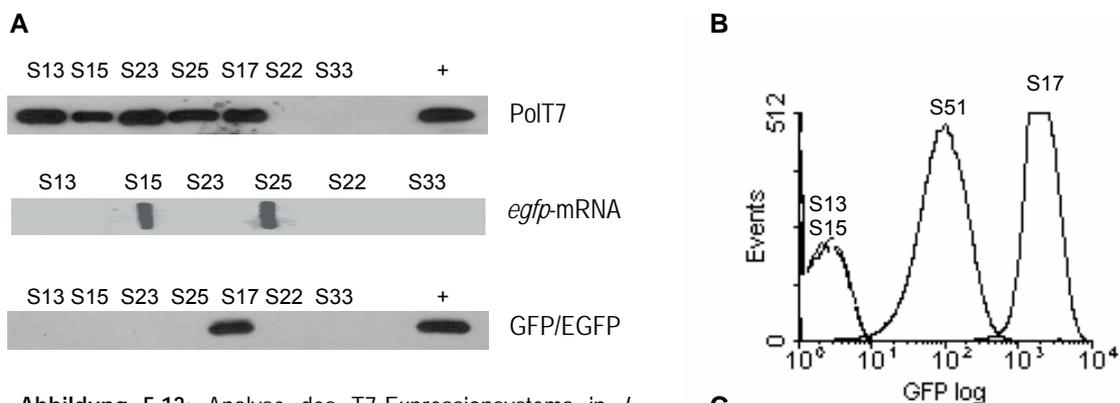
Zur Herstellung von Kontrollstämmen wurde eine Reihe von Plasmiden synthetisiert, in denen jeweils genau ein genetisches Element fehlt, welches zur Synthese von EGFP durch die PolT7-abhängige Transkription in der Bakterienzelle und zur Translation der daraus resultierenden RNA in der eukaryontischen Wirtszelle benötigt wird. Diese sind in den Abschnitten 3.6 (Plasmide) und 3.10 (Bakterienstämmen) tabellarisch zusammengefasst sowie in Abbildung 5.12 nochmals grafisch in der Übersicht wiedergegeben. Die dazu notwendigen Klonierungen sind in Abschnitt 4.6.2 beschrieben. So fehlt in Plasmid pCSA2 der *actA*-Promotor für die Transkription des T7-RNA-Polymerasegens durch die listerielle RNA-Polymerase. Plasmid pCSA3 enthält des *egfp*-Gen zusammen mit einem IRES<sub>EMCV</sub>-

**Abbildung 5.12** (nächste Seite): Grafische Darstellung der Lokalisation der *gfp*- und *polT7*-Gene auf den verschiedenen pCSA- und pCSB-Plasmiden, der Anwesenheit verschiedener, die GFP- und PolT7-Expression beeinflussender genetischer Elemente und Zuordnung der verschiedenen Plasmid-Zweierkombinationen zu den dazugehörigen Stämmen. Abgebildet ist nur der Bereich zwischen der *PstI*- und der *SacI*-Schnittstelle auf den entsprechenden Plasmiden. Für Details siehe Text.



Element unter der Kontrolle von  $P_{actA}$  für eine PolT7-unabhängige Transkription der *egfp*-mRNA direkt durch die listerielle RNA-Polymerase. Des Weiteren fehlen in Plasmid pCSB2 der T7-Promotor und der T7-Terminator sowie in Plasmid pCSB3 das IRES<sub>EMCV</sub>-Element. Plasmid pCSB6 enthält wie Plasmid pCSB1 das *egfp*-Gen zusammen mit einem IRES<sub>EMCV</sub>-Element an seinem 5'-Ende, allerdings unter der Kontrolle des CMV-Promotors für eine Transkription durch die eukaryontische RNA-Polymerase II. Durch Kombination jeweils zweier Kontrollplasmide wurden dann wie in Abbildung 5.12 schematisch dargestellt unterschiedliche Kontrollstämme erhalten.

Um sicherzustellen, dass Stamm S15 nicht selbst bereits GFP bzw. EGFP von kryptischen bakteriellen Promotoren exprimieren kann [118,247], wurde Stamm S15 sowie die in Abbildung 5.13 angegebenen Kontrollstämme bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase in sterilfiltriertem BHI angezüchtet, welches zu einer besonders starken Aktivierung PrfA-abhängiger Gene in *L. monocytogenes* führt (S. Pilgrim, unveröffentlicht). Anschließend wurden Gesamtzellextrakt bzw. Gesamt-RNA isoliert und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Der Nachweis der PolT7-Expression erfolgte mittels Westernblot mit einem PolT7-spezifischen monoklonalen Antikörper und der Nachweis von GFP bzw. EGFP mit einem beide Varianten erkennenden polyklonalen Antikörper. Der Nachweis von *egfp*-mRNA erfolgte mittels Slot-Blot mit einem *egfp*-PCR-Produkt unter hoch-stringenten Bedingungen. Dazu wurde mit Plasmid pSP118-EGFP als Template und den beiden Primern „EGFPcheck sense“ und „EGFPcheck antisense“ ein 705 Bp langer abschnitt von *egfp* amplifiziert und anschließend nichtradioaktiv markiert. Zusätzlich wurde die GFP-Expression auch flusszytometrisch gemessen.



**Abbildung 5.13:** Analyse des T7-Expressionsystems in *L. monocytogenes*.

(A) Bakterien wurden in BHI bis zur spätlogarithmischen Phase unter PrfA-aktivierenden Bedingungen angezüchtet und Gesamtprotein und Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurden PolT7 (oben) und GFP/EGFP (unten) mittels Westernblot und *egfp*-mRNA mittels Slot-Blot (mitte) nachgewiesen.

(B) Flusszytometrischer Nachweis der GFP-Expression in den angegebenen Stämmen nach Wachstum in sterilfiltriertem BHI.

(C) EGFP-Expression nach Lipofektion von Caco-2-Zellen mit einer Mischung von jeweils 200 ng Midiprep der Plasmide pCSA1 und pSP118 (A1), pCSB1 und pSP118 (B1), pCSA1 und pCSB1 (A1 + B1) bzw. pSP118-EGFP und pSP118 (+).

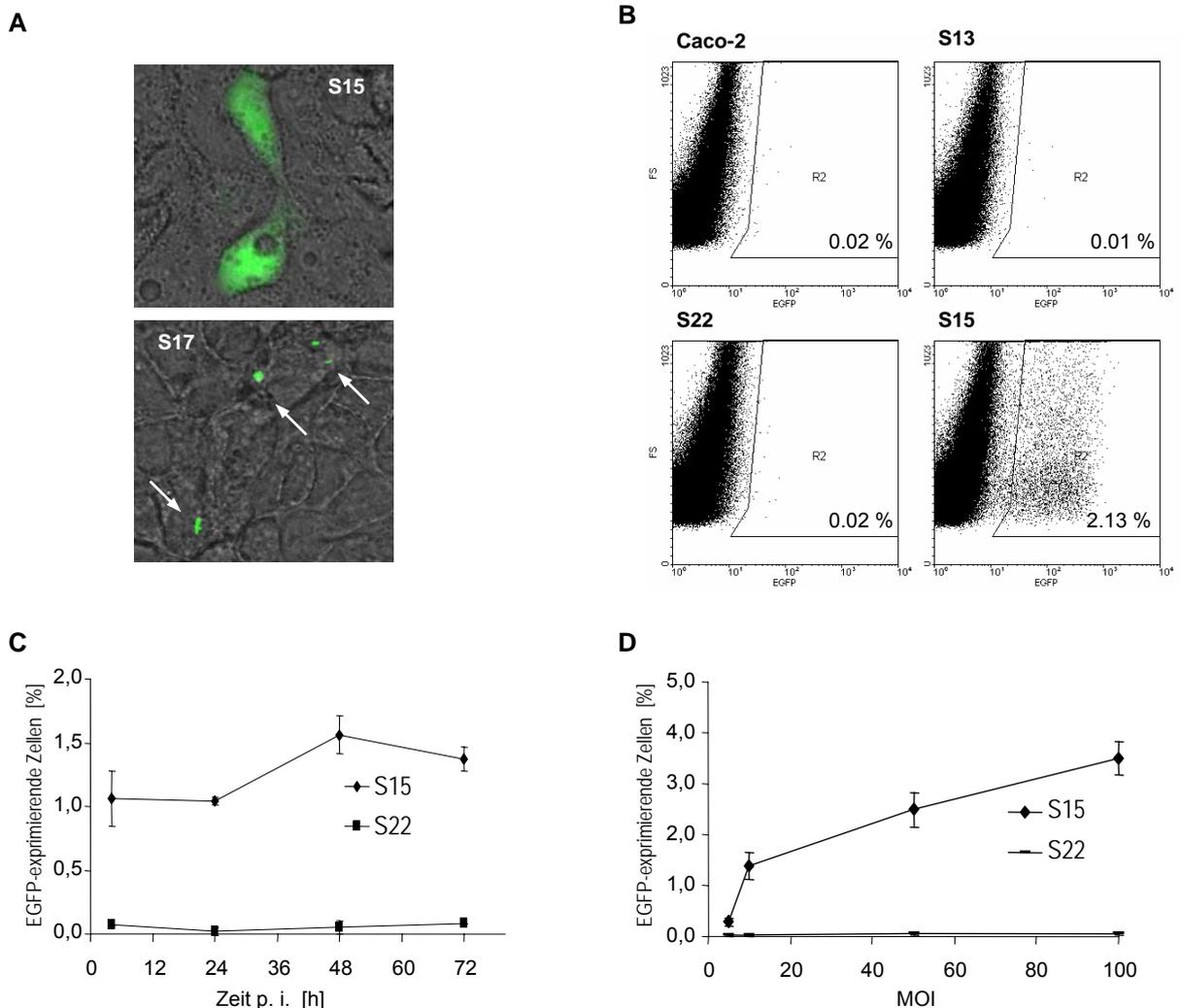
Für Details siehe Text.

Wie in Abbildung 5.13 A zu erkennen, exprimieren diejenigen Stämme die T7-RNA-Polymerase, die das Plasmid pCSA1 enthalten, nicht jedoch Stamm S33 mit Plasmid pCSA2, in welchem  $P_{actA}$  vor *polT7* fehlt. Trotz der PolT7-Expression ist aber nur in Stamm S17, welcher Plasmid pCSB4 trägt mit einer prokaryontischen RBS vor dem *gfp*-Gen auch eine GFP-Synthese nachweisbar (Abbildung 5.13 A und B). Hingegen ist in den Stämmen S15 und S25 zwar eine mRNA-Synthese nachweisbar (Abbildung 5.13 A), aber aufgrund der fehlenden prokaryontischen RBS konnte weder im Westernblot noch in der Durchflusszytometrie eine GFP-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 5.13 A und B). Die mangelnde *gfp*-mRNA-Synthese in Stamm S23 verdeutlicht, dass die Transkription offensichtlich an die Anwesenheit eines T7-RNA-Polymerase-spezifischen Promotors gekoppelt ist. Stamm S13 diente aufgrund der Abwesenheit eines *gfp*-Gens als Negativkontrolle. Wie in der Durchflusszytometrie auch zu erkennen (Abbildung 5.13 B), ist die GFP-Expression durch das T7-Expressionssystem wie in Stamm S17 deutlich stärker als eine direkte Expression durch die listerielle RNA-Polymerase wie in Stamm S51. Durch Austausch der prokaryontischen Ribosomenbindestelle durch das IRES-Element wie in Plasmid pCSA1 in Stamm S15 wird die Expression aber vollständig aufgehoben.

### 5.3.3 Übertragung von EGFP-codierender mRNA in Caco-2-Epithelzellen

Um auszuschließen, dass die beiden Plasmide pCSA1 und pCSB1 direkt zu einer Synthese von EGFP in Säugerzellen führen infolge einer Transkription von *gfp* und/oder *polT7* durch eukaryontische RNA-Polymerasen von kryptischen eukaryontischen Promotoren auf einem der beiden Plasmide [305], wurden Caco-2- und COS-1-Zellen mit einer Kombination beider Plasmide bzw. mit den beiden Plasmiden in jeweils einzelnen getrennten Ansätzen mittels Lipofektion transformiert. Wie anhand der flusszytometrischen Analyse in Abbildung 5.13 C zu erkennen, führt weder eine Lipofektion mit den einzelnen Plasmiden noch eine Lipofektion mit der Kombination beider Plasmide zu einer nachweisbaren EGFP-Synthese in den lipofizierten Zellen. Im Gegensatz dazu exprimierten 48 h nach Lipofektion mit Plasmid pSP118-EGFP 1% aller Caco-2-Zellen und knapp 10% aller COS-1-Zellen EGFP. Wurden hingegen Caco-2-Zellen mit dem die beiden Plasmide pCSA1 und pCSB1 tragenden Stamm S15 infiziert, so war 48 h nach Infektion sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch flusszytometrisch eine deutliche EGFP-Expression durch die eukaryontische Wirtszelle nachweisbar (Abbildung 5.14). Im Gegensatz zu der gleichmäßigen Verteilung der EGFP-Fluoreszenz über das gesamte Zytoplasma der transformierten Zelle nach Infektion mit Stamm S15 war die Fluoreszenz nach Infektion mit dem GFP-exprimierenden Stamm S17 allein auf die prokaryontische Zelle beschränkt (Abbildung 5.14 A). Exprimierten 48 h nach Infektion mit Stamm S15 über 2% aller Caco-2-Zellen EGFP, war weder nach Infektion mit Stamm S22 noch nach Infektion mit Stamm S13 eine EGFP-Expression flusszytometrisch nachweisbar (Abbildung 5.14 B). Bereits 4 h nach Infektion mit Stamm S15 war eine deutliche EGFP-Expression nachweisbar, die 48 h p. i. ihr Maximum erreichte und auch 72 h p. i. noch deutlich nachweisbar war (Abbildung 5.14 C). Dagegen war auch zu diesem späten Zeitpunkt nach Infektion mit Stamm S22 keinerlei EGFP-Expression nachweisbar. Die Anzahl EGFP-exprimierender Zellen war proportional zur Menge eingesetzter Bakterien (Abbildung 5.14 D) und bei einer MOI von 100 exprimierten 72 h p. i. immer noch fast 8% aller Zellen EGFP.

Um zu überprüfen, ob durch Stabilisierung des nicht stabilisierten Plasmids pCSB1 die Anzahl EGFP-exprimierender Zellen weiter gesteigert werden kann und somit den eventuellen Einfluss des Verlusts von Plasmid pCSB1 auf die Transformationseffizienz abzuschätzen, wurden Caco-2-Zellen nach Infektion mit Stamm S15 in Gegenwart von 7,5 µg/ml Tetracyclin inkubiert und die Anzahl der EGFP-exprimierenden Zellen gemessen. Wie in Abbildung 5.14 E zu erkennen, führt die Gegenwart von Tetracyclin nach Infektion auch zu späten Zeitpunkten (72 h p. i.) zu keiner Steigerung der Anzahl an EGFP-exprimierenden Caco-2-Zellen.



**Abbildung 5.14:** EGFP-Expression in Caco-2-Zellen nach Infektion.

(A) Fluoreszenzmikroskopie 48 h nach Infektion mit den Stämmen S15 und S17 (weiße Pfeile). Beachte die unterschiedliche Verteilung der Fluoreszenz.

(B) Flusszytometrische Analyse der EGFP-Expression in uninfizierten Caco-2-Zellen 48 h nach Infektion mit den Stämmen S13, S22 und S15 (MOI50).

(C) Kinetik der EGFP-Expression nach Infektion mit Stamm S15 und nach Infektion mit der Negativkontrolle S22 bei MOI50.

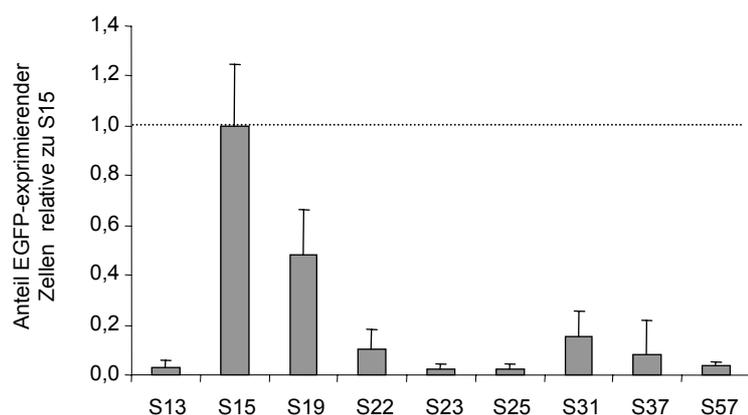
(D) Abhängigkeit der Anzahl EGFP-exprimierender Zellen 48 h p. i. von der eingesetzten MOI.

(E) Einfluss von Tetracyclin (Tc) auf die Anzahl EGFP-exprimierender Caco-2-Zellen nach Infektion mit Stamm S15 (MOI5).

### 5.3.4 Analyse des Übertragungsprozesses in Caco-2-Zellen mittels Infektion mit Kontrollstämmen

Um die Hypothese zu testen, dass *egfp*-mRNA PolT7-abhängig in *L. monocytogenes* transkribiert und nach Freisetzung aus lysierten Bakterienzellen im Zytoplasma der infizierten eukaryontischen Wirtszelle translatiert wird, wurden Caco-2-Zellen mit einer Reihe von Kontrollstämmen infiziert und die EGFP-Expression 48 h nach Infektion flusszytometrisch gemessen. Die Konstruktion dieser Kontrollstämme ist in Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Wie in Abbildung 5.15 A zu erkennen, führt sowohl die Infektion von Caco-2-Zellen mit Stamm S31, welcher Plasmid pCSA2 enthält und damit aufgrund eines fehlenden  $P_{actA}$  keine PolT7 exprimiert (analog Stamm S33 in Abbildung 5.13 A), als auch mit Stamm S22, welcher anstelle von Plasmid pCSA1 Plasmid pSP118 und damit kein *polT7*-codierendes Plasmid enthält, zu einer Reduktion der EGFP-Expression auf Werte, wie sie nach Infektion mit dem als Negativkontrolle verwendeten Stamm S13 erhalten werden. Analog führt die Infektion mit Stamm S23, der anstelle von pCSB1 Plasmid pCSB2 trägt, welches keinen  $P_{T7}$  enthält, als auch mit Stamm S25, dem auf Plasmid pCSB3 das IRES<sub>EMCV</sub>-Element fehlt, zu einer vollständigen Reduktion der EGFP-Expression durch die infizierte Wirtszelle. Auch im Falle der bakteriellen Übertragung von RNA ist die Anzahl EGFP-exprimierender Wirtszellen ohne die Expression des Phagenlysins wie in Stamm S19 im Vergleich zum Ply118-exprimierenden Stamm S15 auf ca. die Hälfte reduziert. Wird die *egfp*-mRNA anstatt durch PolT7 wie in Stamm S15 direkt durch die listerielle RNA-Polymerase von einem *actA*-Promotor aus wie in Stamm S57 synthetisiert, kommt es zu einer annähernd vollständigen Reduktion der Anzahl EGFP-exprimierender Wirtszellen. Auch war nach Infektion mit Stamm S37, der das eukaryontische Expressionsplasmid pCSB6 enthält, in dem das *egfp*-Gen mit zugehörigem IRES<sub>EMCV</sub>-Element unter der Transkriptionskontrolle von  $P_{CMV}$  steht, keine EGFP-Expression in den eukaryontischen Wirtszellen nachweisbar.

**Abbildung 5.15:** EGFP-Expression in Caco-2-Zellen 48 h nach Infektion mit den angegebenen Kontrollstämmen (MOI50). Auf der Ordinate ist jeweils das Verhältnis aus der Anzahl der EGFP-exprimierenden Zellen nach Infektion mit dem auf der Abszisse angegebenen Stamm relativ zu der Anzahl nach Infektion mit Stamm S15 angegeben. Als Negativkontrolle zur Bestimmung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz diente die Infektion mit Stamm S13.

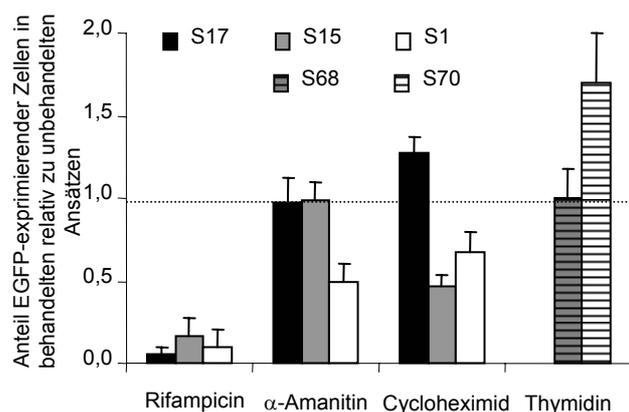


### 5.3.5 Einfluss von spezifischen Transkriptions- und Translationshemmern auf die Expression von EGFP

Zusätzlich zur Infektion mit den verschiedenen Kontrollstämmen wurde auch der Einfluss von Inhibitoren der pro- bzw. eukaryontischen Transkription und Translation auf die EGFP-Expression in infizierten Caco-2-Zellen bestimmt (Abbildung 5.16). Erwartungsgemäß wurde die prokaryontische GFP-Expression in Stamm S17 nur durch Inkubation in Gegenwart von Rifampicin unterbunden. Rifampicin ist ein starker Inhibitor der prokaryontischen RNA-Polymerase, hemmt jedoch weder die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase noch die durch eukaryontische RNA-Polymerasen. Zusätzlich zu Rifampicin wurde die EGFP-Expression in Caco-2-Zellen nach Infektion mit Stamm S1 auch durch geringe Konzentrationen an  $\alpha$ -Amanitin herabgesetzt, welches spezifisch die eukaryontische RNA-Polymerase II hemmt [197,308], als auch durch Cycloheximid, welches ausschließlich die Translation an eukaryontischen Ribosomen unterbindet [239]. Hingegen wurde die EGFP-Synthese in den eukaryontischen Zellen nach Infektion mit Stamm S15 nur durch Inkubation mit Rifampicin und Cycloheximid, nicht aber durch  $\alpha$ -Amanitin reduziert.

Um den unterschiedlichen Einfluss der Mitose und damit des Kernimports auf die EGFP-Expression in Caco-2-Zellen nach bakterieller Übertragung EGFP-codierender Plasmid-DNA bzw. RNA zu untersuchen, wurden Caco-2-Zellen 48 h vor Infektion wieder durch Inkubation in Gegenwart von 7,5 mM Thymidin in der G1/S-Phase des Zellzyklus geblockt und unmittelbar nach Infektion mit den spreadingdefekten  $\Delta actA$ -Mutanten S70 bzw. S68 durch Inkubation in thymidinfreien Medium in die Mitose entlassen. Um Unterschiede in der Infektionsrate zwischen behandelten und unbehandelten Zellen sowie zwischen DNA- und RNA-Überträgerstämmen zu berücksichtigen, wurden parallel dazu durch Infektion mit den GFP-exprimierenden und ebenfalls spreadingdefekten Mutanten S67 und S54 die Anzahl der tatsächlich infizierten Zellen mittels Flusszytometrie 4 h nach Infektion gemessen und wie in Abschnitt 5.2.3 der Quotient aus der Anzahl der EGFP-exprimierenden Zellen 48 h nach Infektion mit den Stämmen S70 bzw. S68 und der Anzahl infizierter Zellen 4 h nach Infektion mit den Stämmen S54 bzw. S67 gebildet. Wie in Abbildung 5.16 zu erkennen, führt eine gesteigerte Mitoserate zu einer ca. 1,7fach erhöhten Anzahl an EGFP-exprimierenden Zellen nach Übertragung von Plasmid-DNA durch Infektion mit Stamm S70. Hingegen ist nach Infektion mit dem Stamm S68 der Anteil EGFP-exprimierender Caco-2-Zellen in thymidinvorbehandelten und in unbehandelten Zellen gleich groß.

**Abbildung 5.16:** EGFP-Expression in Caco-2-Zellen 48 h nach Infektion mit den angegebenen Kontrollstämmen (MOI50) in Gegenwart spezifischer Inhibitoren. Auf der Ordinate ist das Verhältnis der EGFP-exprimierenden Zellen in behandelten Ansätzen relativ zu unbehandelten Kontrollansätzen wiedergegeben. Bei Behandlung mit Thymidin wurde die Anzahl der EGFP-exprimierenden Zellen jeweils auf die Anzahl tatsächlich infizierter Zellen bezogen, die in parallelen Experimenten separat bestimmt wurden.



### 5.3.6 Analyse der Transformationseffizienz in verschiedenen Zelltypen

Um zu testen, ob die bakterielle Übertragung von *egfp*-mRNA auch auf andere Zelltypen außer Caco-2-Zellen möglich ist und um gegebenenfalls deren Effizienz analog wie in Abschnitt 5.2.3 abschätzen zu können, wurden HepG2-Zellen, Caco-2-Zellen, P388.D1-Makrophagen sowie FSDC mit Stamm S15 sowie der spreadingdefekten  $\Delta actA$ -Mutante S68 bei einer MOI von 50 infiziert und die EGFP-Expression 4 h und 48 h p. i. flusszytometrisch gemessen. In parallelen Ansätzen wurde durch Infektion mit dem gleichfalls spreadingdefekten und GFP-exprimierenden Stamm S67 unter identischen Infektionsbedingungen die Zahl der initial infizierten Wirtszellen abgeschätzt. Zusätzlich wurde wie in Abschnitt 5.2.3 über einen MTT-Test die relative Anzahl vitaler Zellen  $V_i(t)$  nach Infektion gemessen. Die Berechnung der Transformationseffizienz  $\eta_i(t)$  sowie des Anteils vitaler und transformierter Zellen  $\beta$  erfolgte wieder wie in Abschnitt 5.2.3 beschrieben. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Tabelle 5.3 wiedergegeben.

Tabelle 5.3: Abschätzung der Effizienz der bakteriellen Übertragung von RNA in professionellen und nichtprofessionellen Phagozyten

	Nichtprofessionelle Phagozyten		Phagozytische Zellen	
	Caco-2	HepG2	P388.D1	FSDC
<b>1. Abschätzung der Transformationseffizienz</b>				
Infizierte Zellen $I_{S67}(t)$ [%]				
4 h p. i.	6.54 ± 0.66	0.72 ± 0.23	13.87 ± 0.06	31.2 ± 1.41
Transformierte Zellen $T_i(t)$ [%]				
- S15 ( <i>actA</i> <sup>+</sup> )				
4 h p. i.	1.56 ± 0.17	0.33 ± 0.09	0.79 ± 0.05	0.19 ± 0.09
48 h p. i.	1.86 ± 0.13	0.30 ± 0.02	2.17 ± 0.56	0.20 ± 0.01
- S68 ( <i>actA</i> <sup>-</sup> )				
48 h p. i.	1.16 ± 0.07	n. d.	1.22 ± 0.15	n. d.
Transformationseffizienz $\eta_i(t)$ [%]				
4 h p. i.	23.9 ± 3.5	45.8 ± 19.2	5.70 ± 0.36	0.61 ± 0.29
48 h p. i.	17.7 ± 2.1	n. d.	8.79 ± 1.08	n. d.
<b>2. Abschätzung der Zahl vitaler transformierter Zellen</b>				
Vitale Zellen $V_i(t)$ [%]				
48 h p. i.	78 ± 6	95 ± 3	77 ± 11	77 ± 1
Vitale transformierte Zellen $\beta$ [%]				
48 h p. i.	1.41 ± 0.15	0.23 ± 0.03	2.39 ± 0.55	0.15 ± 0.01

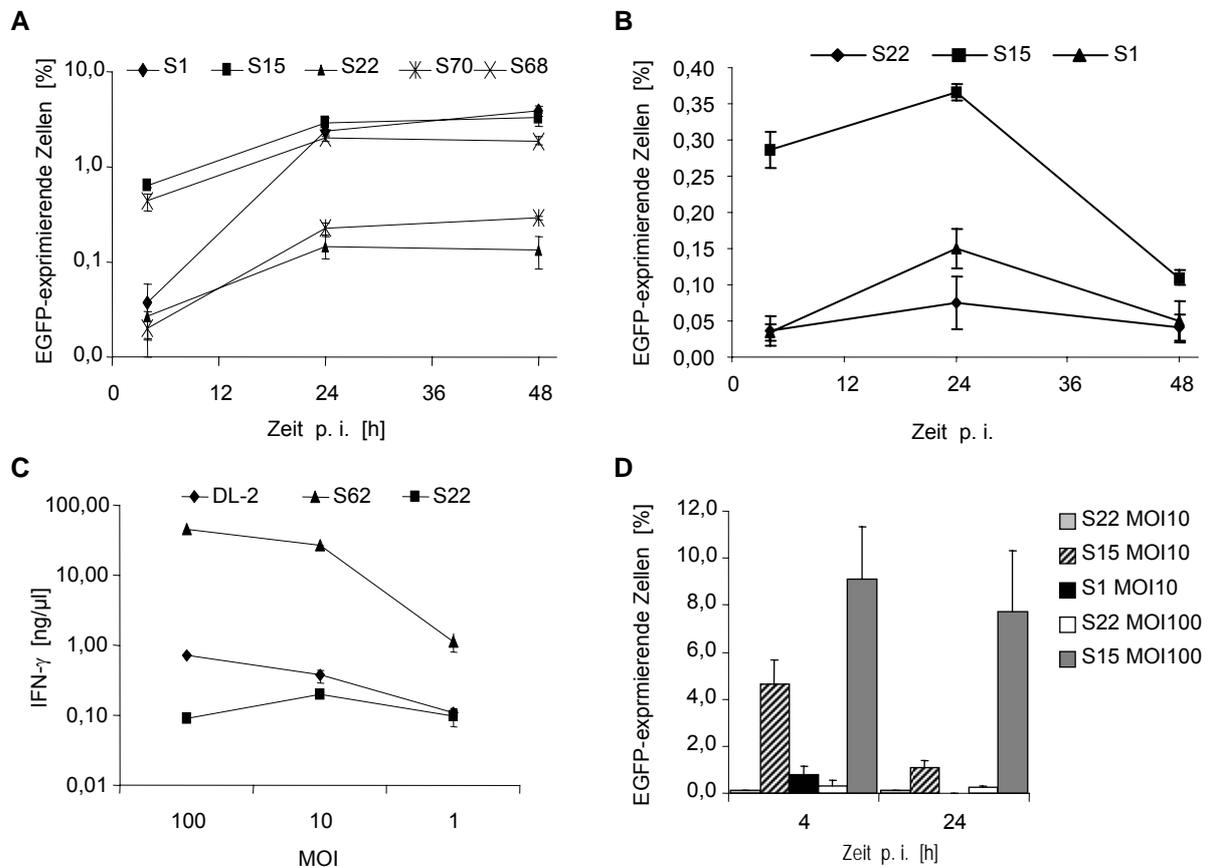
Erneut war der Anteil infizierter Zellen  $I_{S67}(4h)$  bei P388.D1-M $\Phi$  und FSDC um den Faktor 2-40 über den der nichtprofessionell phagozytischen Zellen Caco-2 und HepG2. Die Werte lagen aber alle unter den für die bakterielle Übertragung von Plasmid-DNA gemessenen Werten  $I_{S54}(4h)$  (Tabelle 5.2). Allerdings war auch hier wie im Falle der bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA die Anzahl transformierter Zellen  $T_i(t)$  bei den nichtprofessionellen Phagozyten vergleichbar mit der nach Infektion von phagozytischen Zellen. Demnach ergibt sich wie im Falle der bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA auch im Falle der bakteriellen Übertragung von RNA auf phagozytische Zellen eine deutlich niedrigere Transformationseffizienz  $\eta_i(t)$  als im Falle einer Übertragung auf nichtprofessionelle Phagozyten.

Auffallend war im Gegensatz zur bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA aber die deutlich früher einsetzende Expression von EGFP in allen untersuchten Zelltypen, wobei die Anzahl transformierter Zellen 48 h p. i. geringer war als im Falle der Übertragung von Plasmid-DNA mit Stamm S1. Insgesamt lag damit die Transformationseffizienz  $\eta_i(t)$  insbesondere bei den professionell phagozytischen Zelllinien deutlich über der der bakteriellen Plasmid-DNA-Übertragung (Tabellen 5.2 und 5.3). Das Spreading hatte im Falle der Übertragung von RNA mit den Stämmen S15/S68 keinen so großen Einfluss auf  $\eta_i(t)$  wie im Falle der Übertragung von Plasmid-DNA mit den Stämmen S1/S70. Auch waren die zytotoxischen Effekte des verwendeten Trägerstammes S15 über alle Zelltypen in etwa gleich und insbesondere geringer als die von Stamm S1.

### 5.3.7 Übertragung von mRNA auf antigenpräsentierende Zellen

Die Kinetik der EGFP-Expression war nach Übertragung von EGFP-codierender RNA in P388.D1-Makrophagen und FSDC (Abbildung 5.17 A und B) ähnlich wie die nach Infektion von Caco-2-Zellen (vgl. Abbildung 5.14 C). Auch hier war bereits 4 h p. i. eine deutliche Expression nachweisbar, wohingegen die Übertragung von EGFP-codierender Plasmid-DNA durch Stamm S1 erst zu späteren Zeitpunkten und in einer geringeren Anzahl an Zellen zu einer EGFP-Expression führte. Wie der Vergleich der Anzahl an EGFP-exprimierenden P388.D1-Makrophagen nach Infektion mit den spreadingdefekten Stämmen S68 und S70 mit der nach Infektion mit den spreadingkompetenten Stämmen S15 und S1 weiter zeigt, war im Gegensatz zur bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA die Effizienz der Übertragung von RNA nicht so sehr vom Spreadingverhalten des entsprechenden Trägerstammes abhängig (Abbildung 5.17 A).

Um zu untersuchen, ob sich außer EGFP-codierender RNA auch andere RNA-Spezies übertragen lassen und um gleichzeitig zu überprüfen, ob das codierte Protein nicht nur exprimiert, sondern von antigenpräsentierenden Zelle auch im Kontext der MHC-I-Präsentation spezifischen T-Zellen präsentiert werden kann, wurde Stamm S62N konstruiert. Dieser beherbergt anstelle von Plasmid pCSB1 das Plasmid pCSB7, welches wie Plasmid pCSB1 den T7-Promotor und das IRES<sub>EMCV</sub>-Element enthält, aber statt *egfp* den codierenden Abschnitt für einen Teilbereich des Ovalbumins (*ova<sub>cyt</sub>*). Um die bakterielle Übertragung von OVA<sub>cyt</sub>-codierender RNA mit der von Plasmid-DNA vergleichen zu können, wurde Stamm DL-2 von D. Löffler zur Verfügung gestellt. Stamm DL-2 trägt ein OVA<sub>cyt</sub>-codierendes Expressionsplasmid, welches wie Plasmid pSP118-EGFP ein Derivat von



**Abbildung 5.17:** Übertragung von RNA auf antigenpräsentierende Zellen *in vitro*.

(A) Kinetik der EGFP-Expression in P388.D1-MΦ nach Übertragung von *egfp*-mRNA durch die Stämme S15 und S68 bzw. nach Übertragung von EGFP-codierender Plasmid-DNA durch die Stämme S1 und S70 (MOI50).

(B) Kinetik der EGFP-Expression in FSDC nach Übertragung von *egfp*-mRNA durch Stamm S15 bzw. von Plasmid-DNA durch Stamm S1.

(C) Präsentation des MHC-I-Epitops SIINFEKL durch IC21-Makrophagen 4 h nach Übertragung von *ova<sub>cyt</sub>*-mRNA durch Stamm S62N bzw. von *OVA<sub>cyt</sub>*-codierender Plasmid-DNA durch Stamm DL-2.

(D) Kinetik der EGFP-Expression in primären hmoDC nach Übertragung von *egfp*-mRNA durch Stamm S15 bzw. von Plasmid-DNA durch Stamm S1 mit zwei verschiedenen MOI.

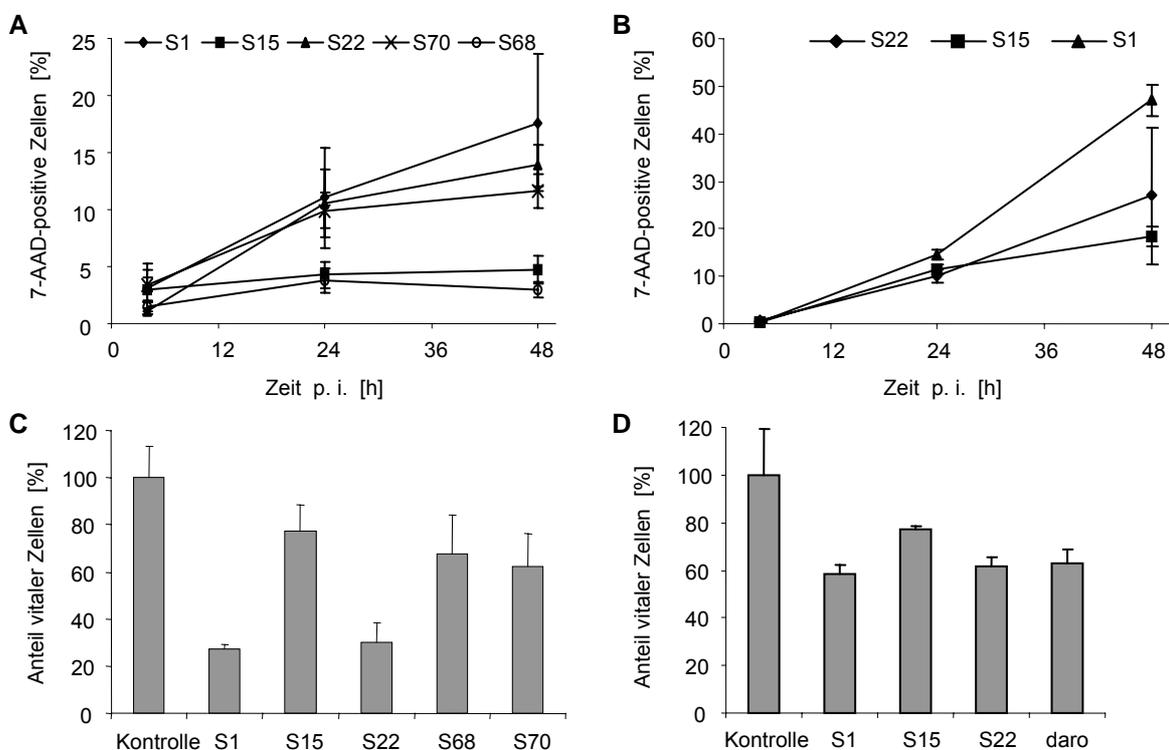
Plasmid pSP118 ist und anstelle von *egfp* die codierende Sequenz von *OVA<sub>cyt</sub>* enthält, welche unter der Kontrolle des CMV-Promotors zur Expression durch die eukaryontische Wirtszelle steht (D. Löffler, unveröffentlicht). Vier Stunden nach Infektion von IC21-Makrophagen mit der Negativkontrolle S22 sowie den Stämmen S62N und DL-2 wurden SIINFEKL-spezifische CD8-T-Zellen zu den infizierten Makrophagen gegeben und die von aktivierten T-Zellen freigesetzte Menge an IFN- $\gamma$  im Überstand nach weiteren 14 h Koinkubation gemessen. Wie in Abbildung 5.17 C zu erkennen, führte die Übertragung von *ova<sub>cyt</sub>*-mRNA zu einer effektiven Expression und Präsentation des von *OVA<sub>cyt</sub>* abgeleiteten Epitops SIINFEKL. Hingegen resultierte die Übertragung von Plasmid-DNA nur in einer sehr geringen Expression und damit Präsentation dieses Epitops.

Um zu überprüfen, ob eine bakterielle Übertragung von EGFP-codierender RNA auch auf primäre APC möglich und effektiver als die Übertragung von Plasmid-DNA ist, wurden primäre hmoDC aus

monozytären Vorläuferzellen des peripheren Bluts kultiviert und mit den Stämmen S1 und S15 sowie der Negativkontrolle S22 *in vitro* infiziert. Wie in Abbildung 5.1.7 D exprimierten annähernd 5% der hmoDC bereits 4 h p. i. EGFP und bei einer höheren MOI stieg dieser Wert auf knapp 10%. Im Gegensatz dazu führte die Übertragung von Plasmid-DNA lediglich zu 0,8% EGFP-exprimierenden Zellen 4 h p. i.

### 5.3.8 Zytotoxizität der RNA-Trägerstämme *in vitro*

Obwohl die Anzahl der EGFP-exprimierenden Zellen nach Übertragung von *egfp*-mRNA größer war als nach Übertragung von EGFP-codierender Plasmid-DNA, waren die zugehörigen Trägerstämme für antigenpräsentierende Zellen weit weniger zytotoxisch als die entsprechenden Stämme zur Übertragung von Plasmid-DNA (Abbildung 5.18).



**Abbildung 5.18:** Zytotoxische Effekte in antigenpräsentierenden Zellen nach Übertragung von RNA bzw. Plasmid-DNA mittels verschiedener *L. monocytogenes*-Stämme *in vitro*.

(A) Anteil toter, aber noch nicht lysierter P388.D1-Makrophagen nach Infektion mit den RNA-Delivery-Stämmen S15 und S68 bzw. den DNA-Delivery-Stämmen S1 und S70 (MOI50).

(B) Anteil toter, aber noch nicht lysierter FSDC nach Infektion mit den RNA-Delivery-Stämmen S15 und S68 bzw. den DNA-Delivery-Stämmen S1 und S70 (MOI50).

(C) Prozentsatz der mittels MTT-Test bestimmten vitalen P388.D1-Makrophagen 48 h nach Infektion mit den unter (A) angegebenen Stämmen.

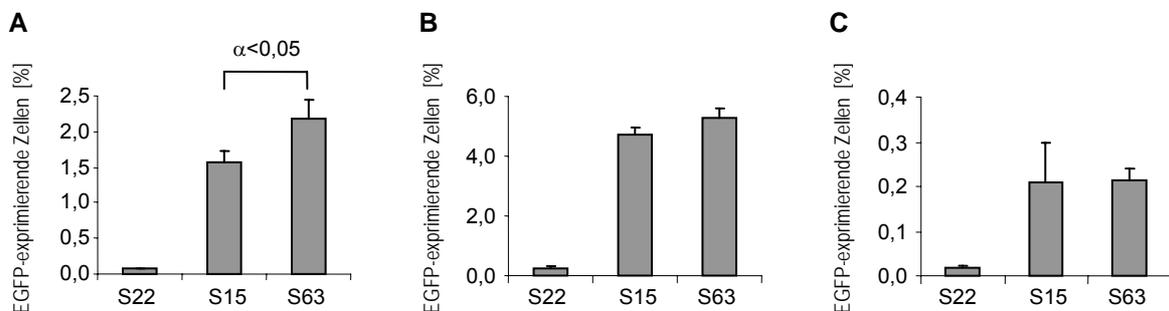
(D) Prozentsatz der mittels MTT-Test bestimmten vitalen FSDC 48 h nach Infektion mit den unter (B) angegebenen Stämmen. Nichtinfizierte Zellen dienten in (C) und (D) als Kontrolle und wurden als 100% vital gesetzt.

So waren sowohl in P388.D1-M $\Phi$  (Abbildung 5.18 A) als auch in FSDC (Abbildung 5.18 B) der Anteil 7-AAD-positiver und damit avitaler Zellen [291] nach Infektion mit den Stämmen S1 und S70 zu den untersuchten Zeitpunkten höher als nach Infektion mit den korrespondierenden Stämmen S15 und S68. In Übereinstimmung mit den durchflusszytometrischen Ergebnissen waren auch die Werte der

MTT-Tests in den beiden Zelllinien (Abbildung 5.18 C und D). So waren auch 48 h p. i. noch ca. 80% der P388.D1-M $\Phi$  wie auch der FSDC vital und Stamm S15 damit deutlich weniger zytotoxisch als der vergleichbare Stamm S1. Bemerkenswerterweise war der Anteil toter Zellen nach Infektion mit Stamm S22, der keine *egfp*-mRNA synthetisiert (Abbildung 5.13 A), höher als nach Infektion mit Stamm S15 (Abbildung 5.18 A und B) und in P388.D1-M $\Phi$  vergleichbar mit dem nach Infektion mit den Stämmen S1 und S70 (Abbildung 5.18 A und C).

### 5.3.9 Einfluss eines 3'-Poly-A-Traktes auf die frühe EGFP-Expression in phagozytischen Zellen

Da ein Poly-A-Trakt am 3'-Ende einer mRNA je nach IRES-Element [17] und Zelltyp [25] noch zu einer Steigerung der Transformationseffizienz führen kann, wurden Plasmid pCSB5 bzw. Stamm S63 hergestellt. Im Vergleich zu Plasmid pCSB1 ist in Plasmid pCSB5 an das 3'-Ende von *egfp* noch ein homopolymerer Trakt von 98 Adeninresten genetisch fusioniert (Abbildung 5.12). Da im Zusammenhang mit dem Einsatz der bakteriellen Träger zum Zwecke der Vakzinierung eine frühe Expression von besonderem Interesse ist, wurde der Anteil EGFP-exprimierender P388.D1-M $\Phi$  und FSDC 4 h nach Infektion mit den Stämmen S15 und S63 flusszytometrisch gemessen. Stamm S22 diente als Negativkontrolle. Zusätzlich wurden auch Caco-2-Zellen als humane epitheliale Zelllinie neben den beiden genannten Zelllinien murinen Ursprungs infiziert. Wie in Abbildung 5.19 zu erkennen, ist nur in Caco-2-Zellen die EGFP-Expression 4 h p. i. signifikant erhöht. Somit war keine Steigerung der IRES<sub>EMCV</sub>-abhängigen EGFP-Expression durch einen 3'-Poly-A-Trakt in den beiden professionell phagozytischen murinen Zelllinien messbar.

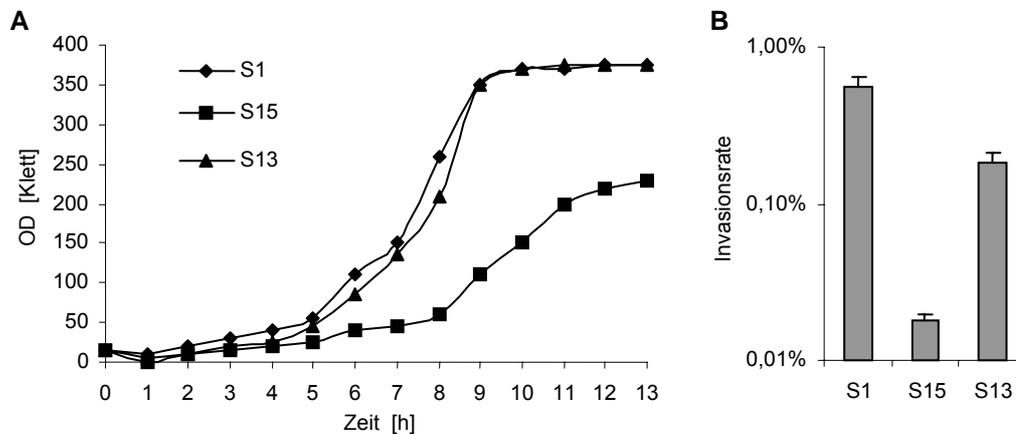


**Abbildung 5.19:** EGFP-Expression 4 h nach Infektion von Caco-2-Zellen (A), P388.D1-Makrophagen (B) bzw. FSDC (C) mit den angegebenen Stämmen bei MOI50 ( $\alpha$ : Signifikanzniveau eines einseitigen ungepaarten t-Tests bei Vergleich der angegebenen Mittelwerte).

### 5.3.10 Einfluss des T7-Expressionssystems auf die Fitness der Trägerbakterien

Wie an Hand des Vergleichs der Wachstumskurven von Stamm S15 und Stamm S1 in Abbildung 5.20 zu erkennen, führt die RNA-Synthese von Plasmid pCSB1 durch das T7-Expressionssystem offenbar zu einer erheblichen Belastung des Stoffwechsels der betreffenden Bakterienzelle. Die bloße Anwesenheit der beiden Plasmide und deren Replikation hingegen führen zu keiner Beeinträchtigung der Fitness, da das Wachstum von Stamm S13, der zwar wie Stamm S15 ebenfalls zwei Plasmide enthält, aber durch das Fehlen eines T7-abhängigen Promotors sowie des Reportergens *egfp* auf Plasmid pFLO1 keine RNA synthetisiert, nicht verlangsamt ist (Abbildung 5.20 A). Analog waren auch die Virulenz bzw. die Invasivität in Caco-2-Zellen *in vitro* im Vergleich zu den Stämmen S1 und S13

in Stamm S15 deutlich herabgesetzt (Abbildung 5.20 B). Somit führt das T7-Expressionssystem zumindest *in vitro* zu einer deutlichen Herabsetzung der Fitness und der Virulenz der betreffenden Bakterienzellen.



**Abbildung 5.20:** Vergleich von Wachstums- und Invasionsraten in verschiedenen Trägerbakterien. (A) Wachstum der angegebenen Stämme in BHI. Aufgetragen ist die optische Dichte in Klett-Einheiten (KE). (B) Invasionsraten (Anteil intrazellulärer Bakterien relativ zur Anzahl eingesetzter Bakterien) der gleichen Stämme wie in (A) bei Infektion von Caco-2-Zellen mit MOI

### 5.3.11 Zusammenfassung

Die experimentellen Ergebnisse des Abschnitts 5.3 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Ergebnisse der T7-Polymerase-abhängigen Expression von GFP in *L. monocytogenes* in den Abschnitten 5.3.2 und 5.3.3 zeigen, dass:
  - (i) *polT7* spezifisch von der listeriellen RNA-Polymerase von  $P_{actA}$  transkribiert wird;
  - (ii) es weder bei Fehlen des *polT7*-Gens noch bei Fehlen eines dazugehörigen T7-Promotors zu einer GFP-Expression kommt;
  - (iii) die listerielle RNA-Polymerase keine Spezifität für den T7-Promotor besitzt und somit die T7-RNA-Polymerase ersetzen könnte;
  - (iv) die T7-RNA-Polymerase auch in *L. monocytogenes* hoch aktiv ist und eine T7-Polymerase-abhängige Transkription von *gfp* zu einer sehr viel stärkeren GFP-Expression führt als die Transkription des *gfp*-Gens direkt durch die listerielle RNA-Polymerase von  $P_{actA}$ ;
  - (v) es keine kryptischen prokaryontischen Ribosomenbindestellen im Bereich des IRES<sub>EMCV</sub>-Elements noch in 5'-Richtung davon gibt, die zu einer prokaryontischen EGFP-Expression führen könnten;
  - (vi) die T7-RNA-Polymerase-abhängige Transkription im Gegensatz zur bloßen Replikation der beiden Plasmide eine erhebliche metabolische Belastung für die bakterielle Zelle darstellt.
2. Die Ergebnisse aus Abschnitt 5.3.4 und 5.3.5 zeigen, dass *egfp*-mRNA in der prokaryontischen Zelle transkribiert und nach Lyse der bakteriellen Trägerzellen in das Zytoplasma der infizierten eukaryontischen Wirtszelle übertragen und anschließend dort auch

translatiert wird. Die beobachtete EGFP-Expression ist somit nicht auf die Transkription von *egfp* oder *polT7* von kryptischen eukaryontischen Promotoren zurückzuführen.

3. Wie in Abschnitt 5.3.7 gezeigt, führt unter ansonsten gleichen Infektionsbedingungen eine Übertragung von *egfp*-mRNA zu einem sehr viel früheren Einsetzen der Reporterexpression in den infizierten APC als die Übertragung von Plasmid-DNA. Ferner scheint die bakterielle Übertragung von mRNA insbesondere in APC effektiver zu sein als die Übertragung antigencodierender Plasmid-DNA.
4. Auch zeigen die Stämme S15 bzw. S68 in allen untersuchten Zelltypen und insbesondere in phagozytischen Zellen weniger zytotoxische Nebeneffekte als die entsprechenden Stämme S1 und S70 (Abschnitt 5.3.8) bei allerdings gleichzeitig reduzierter Fitness (Abschnitt 5.3.10).

## 6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Erzeugung und dem Einsatz von *L. monocytogenes*  $\Delta trpS$  als Trägersystem zur Expression von zellwandverankerten Antigenen bzw. zur Übertragung von antigencodierender Plasmid-DNA und mRNA.

### 6.1 Verankerung heterologer Proteine in der Zellwand von *L. monocytogenes*

Die Exposition von heterologen Antigenen auf der Oberfläche von Trägerbakterien führte in einer Reihe unterschiedlicher Modellsysteme zur Induktion einer potenten systemischen wie auch mukosalen humoralen Immunantwort. Daher existiert bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Systeme für die Oberflächenverankerung heterologer Proteine sowohl für gramnegative als auch für grampositive Bakterien (siehe Übersichtsartikel in [288,357]). In einer Vielzahl von grampositiven Bakterien ist ein Teil der Oberflächenproteine kovalent mit dem Peptidoglykangerüst der Zellwand verknüpft [35]. Diese besitzen an ihrem aminoterminalen Ende ein Sekretionssignalpeptid und an ihrem C-Terminus eine konservierte LPXTG-Sequenz [92], die gefolgt wird von einem Abschnitt mit ca. 20 hydrophoben und einem daran anschließenden kurzen Bereich mit positiv geladenen Aminosäuren. Zunächst werden die zu verankernden Proteine aufgrund ihres N-terminalen Sekretionssignals über den Sec-abhängigen Proteinexportweg aus dem Zytoplasma der Bakterienzelle exportiert [345]. Während ihres Exports wird das N-Terminale Sekretionspeptid entfernt sowie das LPXTG-Ankermotiv an ihrem C-Terminus zwischen den Thr- und Gly-Resten durch das Enzym Sortase geschnitten und das so prozessierte Protein anschließend in einer Transpeptidierungsreaktion kovalent mit einer Peptidbrücke des Peptidoglykangerüst der Zellwand verknüpft [236,238]. Aufgrund ihrer universellen Verbreitung [92] bietet sich das LPXTG-Ankermotiv für eine kovalente Verankerung heterologer Antigene in der Zellwand grampositiver Bakterien an. In einer Reihe von grampositiven Bakterien wie z. B. verschiedener Spezies koagulase-negativer Staphylokokken [134,289] als auch kommensaler *Lactobacillus* spp. [253] und *Streptococcus gordonii* [266] gelang so die kovalente Zellwandverankerung von z. T. auch sehr großen Antigenen [133]. Eine mukosale Immunisierung von Versuchstieren mit derartigen rekombinanten Stämmen führte zur Erzeugung einer mukosalen und teilweise auch protektiven Immunantwort [36,220].

*L. monocytogenes* besitzt über 40 Zellwandproteine, die über ein derartiges LPXTG-Ankermotiv mit der Zellwand verbunden sind [35], darunter auch InIA [69]. Daher wurde dieses als Plattform benutzt, um in der Zellwand von *L. monocytogenes* die kovalente Verankerung heterologer Proteine zu versuchen. Die Klonierungsstrategie zur Erzeugung von Fusionsproteinen, die über das InIA-Ankermotiv in der Zellwand verankert sind, ist in Abschnitt 4.6.3 beschrieben. Aufgrund seiner Stabilisierung bildete das Plasmid pSP0 die Grundlage für die Klonierungen. Die verankerte Form von InIA hat ein errechnetes Molekulargewicht von ca. 83 kDa (765 AS), die verankerten Formen von ActA (234 AS), GFP (237 AS) und OVA (240 AS) liegen mit jeweils ca. 38 kDa deutlich darunter.

Wie durch Westernblot (Abbildungen 5.3 A und 5.4 A), Immunfluoreszenzmikroskopie (Abbildungen 5.2 B und 5.3 B) und Immunogold-EM (Abbildung 5.2 A) gezeigt werden konnte, ist die heterologe

Verankerung unterschiedlicher Proteine über das LPXTG-Motiv von InlA auch in der Zellwand von *L. monocytogenes* möglich. Insbesondere konnten so auch Proteine eukaryontischer Herkunft wie GFP und OVA verankert werden, und zumindest im Falle des ActA-Proteins konnte die Expression und Oberflächenverankerung auch im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle nachgewiesen werden (Abbildung 5.2 B).

Die heterologe Expression von GFP in einer funktionalen Konformation konnte bereits auf der Zelloberfläche von *E. coli* [194,302] und *Saccharomyces cerevisiae* [147] gezeigt werden. Obwohl GFP als zytoplasmatisches Protein von sich aus nicht in der Lage ist, die Zellmembran zu durchqueren [213], steht seine dreidimensionale Struktur einem erfolgreichen Transport als Hybridprotein durch Proteintransportsysteme somit nicht im Wege. Außerdem zeigt dies, dass GFP auch als oberflächenverankertes Protein zur Ausbildung der korrekten Konformation fähig ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in *E. coli* und *S. cerevisiae* war im Falle der Verankerung von GFP in der Zellwand von *L. monocytogenes* jedoch keine Fluoreszenz nachweisbar (Abbildung 5.3 C). In grampositiven Bakterien wie *B. subtilis* wird die korrekte Faltung von Zellwandproteinen nach ihrer Sekretion durch die zytoplasmatische Membran unter anderem durch Chaperone wie z. B. PrsA, Thioldisulfidoxidoreduktasen und Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  beeinflusst [23]. So waren im Falle der heterologen Expression der humanen Pankreasamylase (HPA) als sezerniertem Protein durch *B. subtilis* alle translozierten Moleküle falsch gefaltet [23]. Wie des Weiteren für *B. subtilis* gezeigt werden konnte, können auch elektrostatische Interaktionen mit der negativ geladenen Zellwand die Funktionsfähigkeit eines Proteins beeinflussen [151,313,332]. Schließlich haben sowohl bei *S. aureus* als auch bei *B. subtilis* Oberflächen- sowie extrazelluläre Proteasen einen negativen Effekt auf die Oberflächenverankerung von heterologen Proteinen [160,312,368]. Da auf der Grundlage der publizierten Genomdaten über 80% der Proteine von *L. monocytogenes* EGD-e [114] homolog sind zu Proteinen aus *B. subtilis* 168 [175], dürften zumindest einige dieser Faktoren in beiden Organismen ähnlich und daher auch einige der Aussagen zu *B. subtilis* auf *L. monocytogenes* übertragbar sein. Da der spontane Faltungsvorgang von GFP nur sehr langsam und unvollständig abläuft, ist die Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur abhängig von derartigen äußeren Randbedingungen [213]. Daher könnte das GFP trotz der nachweisbaren Expression in der Zellwandfraktion beim Transport durch die Zellmembran und/oder nach der Verankerung in der bakteriellen Zellwand möglicherweise nicht korrekt gefaltet worden sein.

Ferner war aber im Falle der zellwandverankerten Expression von OVA *in vitro* keine Antigenpräsentation messbar (Abbildung 5.4 B). Zum einen wurde durch die Expression großer Mengen heterolog verankerter Proteine weniger InlA in der Zellwand exprimiert (Abbildung 5.5 A) und passend dazu war auch die von InlA-abhängige Invasion von Caco-2-Zellen [101-103] im Vergleich zu Kontrollstamm A31 um bis zu zwei Logstufen herabgesetzt (Abbildung 5.5 B). Wie zum anderen anhand der herabgesetzten Wachstumsgeschwindigkeit v. a. von Stamm A30 in BHI zu erkennen, setzt die Zellwandverankerung heterologer Proteine je nach Expressionsstärke aber auch die Fitness der rekombinanten Listerien generell herab (Abbildung 5.5 C) und damit möglicherweise ihre Fähigkeit, nach Phagozytose durch  $\text{M}\Phi$  aus dem Phagosom zu entkommen, sich im Zytoplasma der

infizierten Zelle zu replizieren und damit auch zu einer Synthese des heterolog exprimierten Antigens (Abbildung 5.5 D). Wie zumindest für *E. coli* bereits beschrieben wurde, kann die massive Integration fremder Proteine den geordneten Aufbau der bakteriellen Zellmembran und/oder Zellwand stören [111,311]. Daher könnte auch in *L. monocytogenes* die Zellwandarchitektur durch eine übermäßige Expression heterologer Zellwandproteine gestört werden.

Offensichtlich stellt aber allein schon die starke Expression eines heterologen Antigens ohne dessen Zellwandverankerung eine nicht unerhebliche metabolische Belastung dar und führt dadurch zu einer herabgesetzten Virulenz [104], wie auch an den im Vergleich zu Stamm A31 deutlich herabgesetzten Invasionsraten der Stämme A54 und A56 in P388.D1-MΦ zu erkennen ist (Abbildung 5.5 D). In Übereinstimmung mit diesen *in vitro*-Daten konnte ferner gezeigt werden, dass die bakterielle Belastung der Leber nach *i. v.*-Infektion mit einem Stamm, der aufgrund Plasmid pAOT OVA exprimiert, im Vergleich zu einem Stamm, der Plasmid pSP118 trägt und damit kein OVA exprimiert, um über zwei Logstufen herabgesetzt ist (Daniela Löffler, in Vorbereitung).

Folglich wäre statt einer starken plasmidabhängigen Expression des Antigens eine schwächere Expression zu bevorzugen was z. B. durch die Integration des für das heterologe Antigen codierenden Gens in das Chromosom des Trägerstamms zu erreichen wäre [300]. Ferner wäre die Expression von heterologen, prokaryontischen Zellwandproteinen vorzuziehen, da sie vermutlich die Architektur der Zellwand weniger durcheinanderbringen als zytoplasmatische Proteine. In jedem Fall ist zu berücksichtigen, dass die limitierenden Faktoren für jedes zu verankernde Protein verschieden sein können und somit Vorhersagen für den Einzelfall nur schwer zu machen sind [23].

## **6.2 Baktinfektion von Säugerzellen mittels *L. monocytogenes***

Eine Alternative zur prokaryontischen Expression von Antigenen ist die eukaryontische Expression nach bakterieller Übertragung geeigneter Expressionsplasmide auf antigenpräsentierende Zellen (Übersichtsartikel in [74,201,293]).

Um den Prozess der bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA auf eukaryontische Zellen näher zu analysieren und darauf aufbauend Möglichkeiten zu finden, auch die Anzahl transformierter APC nach Baktinfektion mittels *L. monocytogenes* zu optimieren, wurde der Infektionsprozess, beginnend mit der Invasion der Wirtszelle bis zur Präsentation des codierten Antigens, in verschiedene Abschnitte unterteilt (Abbildung 2.3). Eine Optimierung des Gesamtprozesses erfordert somit eine Optimierung dieser Einzelschritte und umgekehrt würde jede Verbesserung eines Einzelschritts auch die Baktinfektionsrate insgesamt verbessern. Im Rahmen der Analyse des Baktinfektionsvorganges wurden insbesondere die Schritte 3 bis 6, d. h. von der Freisetzung des Bakteriums aus dem Phagosom bis zur Expression des codierten Antigens experimentell näher untersucht.

Die Anzahl transformierter Zellen kann bei spreadingdefizienten Bakterien nicht größer sein als die Anzahl primär infizierter Zellen. Wie in Tabelle 5.2 zu erkennen, variiert die Anzahl der primär infizierten Zellen je nach Zelltyp über einen Bereich von zwei Logstufen und liegt selbst bei

professionell phagozytischen Zellen weit unter der Idealmarke von einhundert Prozent. Es ist offensichtlich, dass eine höhere Invasivität der Trägerstämme bei gleichzeitig nicht gesteigener Zytotoxizität die Infektionsrate und damit im Endeffekt auch die Transformationsrate erhöhen sollte. Im Einklang damit konnte gezeigt werden, dass *aro*-Mutanten von *L. monocytogenes* [318], die eine erhöhte InIA- und InIB-Expression und damit verbunden eine vier- bis zehnmal höhere Invasivität in Caco-2- und HBMEC-Zellen zeigen [319], *in vitro* nach Baktofektion im Vergleich zu *aro*-Wildtypstämmen zu einer gesteigerten Transformation dieser Zelltypen führten [255]. Daneben fördert in Zellkultur das Spreading der Bakterien die Übertragung von Plasmid-DNA (Tabelle 5.2) einerseits dadurch, dass im Laufe der Zeit mehr und mehr Zellen infiziert werden und schließlich je nach Zelltyp der gesamte Zellrasen *in vitro* infiziert ist [119]. Andererseits scheint auch die Freisetzung der Listerien aus der sekundären Vakuole die Übertragung von Plasmid-DNA noch zusätzlich zu fördern [255]. So waren nach Mikroinjektion des Trägerstammes S1 die meisten EGFP-exprimierenden Zellen nicht die primär injizierten Zellen, sondern diejenigen, die sich in der Nachbarschaft von primär injizierten Zellen befanden (Abbildung 5.8 B). Da im Medium bakterizide Konzentrationen an Gentamicin vorhanden waren, konnten diese Zellen nur durch Spreading von Bakterien aus benachbarten Zellen infiziert worden sein. Im Gegensatz dazu exprimierten nach Injektion von Stamm S70 nur die primär injizierten Zellen EGFP (Abbildung 5.8 A), da auch hier die Anwesenheit bakterizider Konzentrationen an Gentamicin im Zellkulturmedium eine Reinfektion von Zellen durch Listerien, die aus primär injizierten Wirtszellen freigesetzt wurden, verhinderte. Um eine möglichst effiziente Transformation nach Baktofektion mit *L. monocytogenes* zu erreichen, sollten daher keine  $\Delta actA$ -Mutanten als Trägerstämme verwendet werden.

Sind die Trägerstämme nach der Freisetzung aus dem phagosomalen Kompartiment im Zytoplasma der Wirtszelle angelangt, so sollten sie dort möglichst quantitativ lysieren und die Plasmid-DNA freigeben. Diese Lyse kann durch die Expression des unter der Kontrolle des *actA*-Promotors stehenden Endolysingens *ply118* des Bakteriophagen A118 gesteigert werden [72]. Infiziert man z. B. FSDC mit den Stämmen S1 und S0 (Abbildung 5.6 A), so führt die Expression von Ply118 in Stamm S1 zu einer bis zu zehnmal höheren Anzahl an transformierten Zellen im Vergleich zur Infektion mit Stamm S0. Um zu zeigen, dass die Expression von Ply118 auch tatsächlich erst im Zytoplasma der Wirtszelle voll aktiviert wird und damit unabhängig von einer phagosomalen Passage des Trägerstammes erfolgt, wurden Caco-2-Zellen intrazytoplasmatisch mit dem Stamm S1 injiziert (Abbildung 5.8). Vergleicht man die Anzahl EGFP-exprimierender Caco-2-Zellen 24 h nach Injektion von Stamm S0 mit der nach Injektion von S1 (Abbildung 5.8 C), so erhielt man auch im Falle der intrazytoplasmatischen Mikroinjektion von S1 über zehnmal mehr EGFP-exprimierende Caco2-Zellen als nach Injektion von Stamm S0. Vergleicht man die Werte der beiden  $\Delta actA$ -Stämme S70 und S71 miteinander, so führte auch hier die Expression von Ply118 zu einer um das Doppelte erhöhten Anzahl EGFP-exprimierender Zellen. Ein Vergleich der Werte mit denen nach Injektion von Plasmid-DNA zeigt weiter (Abbildung 5.8 D), dass die Expression von Ply118 zu einer bis zu zehnfach gesteigerten Freisetzung an Plasmid-DNA führt. Somit führt die intrazytoplasmatische Expression von Ply118 in den Bakterien zu einer deutlichen Steigerung der Baktofektionseffizienz.

Ist die Plasmid-DNA in das Zytoplasma der zu transformierenden Zelle freigesetzt und dort nicht durch zytoplasmatische DNAsen abgebaut worden [184,260], so muss sie zu ihrer Expression in den Zellkern importiert werden. Allerdings stellt der Import der Plasmid-DNA in den Zellkern für viele nichtvirale Transformationsverfahren wie z. B. der Lipofektion hinsichtlich der Transformationseffizienz einen limitierenden Faktor dar [183,329,362,374], da DNA-Moleküle in der Regel zu hochmolekular sind, um durch die Kernporen in den Zellkern zu gelangen [232,265]. Im Gegensatz zu DNA-Viren [358] oder dem pflanzenpathogenen Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* [339], die jeweils über spezielle Proteine verfügen, die den Import der genomischen DNA bzw. von Transfer-DNA über die Kernporen in den Kern auch mitotisch inaktiver Zellen gewährleisten, ist im Falle der Lipofektion das nukleäre Kompartiment nur dann für die im Zytoplasma befindlichen DNA-Moleküle zugänglich, wenn sich die Kernmembran im Zuge der Mitose vorübergehend auflöst [30,86,87,230,337]. Wie in Abbildung 5.9 E zu erkennen, ist die Transformationseffizienz wie bei der Lipofektion auch nach Baktinfektion abhängig vom Anteil mitotischer Zellen in der Zellpopulation. Zwar kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass eine wenn auch in ihrer Effizienz stark herabgesetzte Baktinfektion nichtmitotischer Zellen möglich ist [120]. Dennoch scheint aber auf Grund der vorliegenden Daten der Kernimport in ruhende Zellen auch im Falle der Baktinfektion deutlich schlechter und ineffizienter zu sein als in mitotisch aktiven Zellen. Da gerade die für Vakzinierungen so wichtigen antigenpräsentierenden Zellen einschließlich der dendritischen Zellen ausdifferenziert sind, dürfte darin eine der Ursachen liegen, weshalb sie einer Transformation durch Baktinfektion nur schwer zugänglich sind. Umgekehrt heißt das, dass noch nicht vollständig ausdifferenzierte Zellen bzw. Tumorzellen sich zur bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA besonders gut eignen, wie ja auch die Ergebnisse mit verschiedenen Tumorzelllinien belegen [140,255].

Wie in Abbildung 5.9 E weiter zu erkennen ist, ergibt die Lipofektion von ca.  $5 \times 10^5$  Caco-2-Zellen pro Ansatz mit 400 ng Plasmid pSP118-EGFP knapp doppelt so viele Transformanden wie die Baktinfektion mit Stamm S1 bei einer MOI von 50. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichts von pSP118-EGFP (9958 g/mol) und der in Abschnitt 5.2.1 ermittelten Kopienzahl von pSP118-EGFP von ca. 30 pro Bakterienzelle bedeutet das, dass die Lipofektion von ca.  $5 \times 10^7$  Plasmidmolekülen pro Zelle nur wenig effizienter ist als die bakterielle Übertragung von  $1,5 \times 10^3$  Plasmidmolekülen. Daraus folgt, dass bei geringer Plasmidmenge die bakterielle Übertragung *in vitro* somit deutlich effizienter ist als die per Lipofektion. Dies lässt darauf schließen, dass der Transport der Plasmid-DNA durch das phagosomale Kompartiment der eukaryontischen Zelle im Inneren der Bakterienzellen sowie die anschließende lysinvermittelte Freisetzung in das Zytoplasma deutlich effizienter sein müssen als die entsprechenden Prozesse im Falle der Lipofektion [259,374]. Ein Vergleich der Mikroinjektion von Stamm S1 mit der von Plasmid pSP118-EGFP unter Berücksichtigung der Kopienzahl von pSP118 (Tabelle 5.1) zeigt außerdem, dass die Lyse eines einzigen Bakteriums und die Freisetzung der darin enthaltenen Plasmid-DNA im Prinzip ausreicht, um eine Caco-2-Zelle zu transformieren. Im Falle der Lipofektion bedeutet dies, dass nur  $10^{-3}$  % der pro Zelle applizierten Plasmidmoleküle im Zytoplasma ankommen und somit ein erheblicher Teil entweder von den Zellen nicht aufgenommen oder im phagosomalen Kompartiment abgebaut wird. Somit ist wahrscheinlich weniger die absolute Menge an

Plasmid-DNA, die im Zytoplasma vorliegt, als vielmehr ihr Zutritt zum Zellkern einer der entscheidenden Schritte zu einer erfolgreichen Transformation.

Nach dem Import der Plasmid-DNA in den Zellkern erfolgt dort im Falle von Plasmid pSP118-EGFP bzw. Stamm S1 die Synthese der mRNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Abbildung 2.3). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der CMV-Promotor *in vitro* wie auch *in vivo* zu den stärksten und in der größten Anzahl an Geweben und Zelltypen aktiven Promotoren gehört [187,212,356]. Aus Tierexperimenten an Mäusen ist aber bekannt, dass in der frühen Phase der murinen Listeriose die Produktion von IFN- $\gamma$  einer der wichtigsten protektiven Mechanismen der angeborenen Immunität darstellt [33,148]. Da die Transkription vom CMV-Promotor unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  *in vitro* [277] wie auch *in vivo* [324] stark abnimmt, könnte somit im Falle einer Baktofektion mit *L. monocytogenes* die Immunantwort gegen die eingesetzten Trägerstämme auch die Effizienz einer bakteriellen Übertragung von eukaryontischen Expressionsplasmiden *in vivo* beeinträchtigen. Da die Expression unter dem  $\beta$ -Aktinpromotor nicht durch IFN- $\gamma$  beeinflusst wird [294], wurden Plasmid pCAG-EGFP und Stamm D2 konstruiert, in welchen die Transkription von *egfp* unter der Kontrolle des Aktinpromotors erfolgt. Wie in Abbildung 5.10 zu erkennen, führte im Vergleich zu pSP118-EGFP weder im Falle der Lipofektion noch im Falle der Baktofektion die Übertragung von Plasmid pSP118-eEGFP oder pCAG-EGFP in FSDC wie auch in P388.D1-M $\Phi$  zu einer höheren Anzahl an EGFP-exprimierenden Zellen. Auch hatte die Gegenwart von 100 U/ $\mu$ l IFN- $\gamma$  im Kulturmedium keinen Einfluss auf die Anzahl EGFP-exprimierender P388.D1-M $\Phi$  nach Lipofektion mit den Plasmiden pSP118-EGFP, pSP118-eEGFP oder pCAG-EGFP. Im Gegensatz dazu war aber nach Baktofektion mit den Stämmen S1, D1 und D2 in allen drei Ansätzen die Anzahl EGFP-exprimierender P388.D1-M $\Phi$  in Gegenwart von IFN- $\gamma$  deutlich erniedrigt. Somit könnte insbesondere im Falle der Baktofektion mittels *L. monocytogenes* die *in vivo* frühzeitig nach Infektion einsetzende Synthese von IFN- $\gamma$  zu einem verstärkten Abbau der als Träger verwendeten Listerien im Phagosom führen und damit die Übertragung der Plasmid-DNA auf die Zelle nach Baktofektion mit *L. monocytogenes* weiter reduzieren.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente mit den Zelllinien der professionell phagozytischen Zellen und den Plasmiden pSP118-EGFP, pSP118-eEGFP und pCAG-EGFP (Abbildung 5.10) spiegeln auch sehr gut die Ergebnisse aus entsprechenden Untersuchungen *in vivo* wieder [254]. Hierbei wurden BALB/c-Mäuse an den Tagen 0 und 21 mit verschiedenen *L. monocytogenes*  $\Delta$ *trpS*-Stämmen immunisiert, die zu pSP118-EGFP, pSP118eEGFP bzw. pCAG-EGFP analoge Vakzinierungsplasmide trugen. Diese codierten anstelle von EGFP für das als Testantigen benutzte Kinetoplastid-Membranprotein-11 (KMP-11) aus *Leishmania*. Auch hier ergab sich weder in der zellulären Immunantwort gegen KMP-11, gemessen anhand der IL-2- und IFN- $\gamma$ -Freisetzung jeweils nach *ex vivo*-Stimulation mit aufgereinigtem KMP-11 (rKMP-11) sowie anhand der Proliferation von aus immunisierten Mäusen isolierten Milzzellen, noch in der humoralen Immunantwort, gemessen anhand der Antikörperspiegel gegen KMP-11, ein Unterschied zwischen der Expression von KMP-11 unter dem CMV- und  $\beta$ -Aktinpromotoren bzw. unter der Kombination aus dem CMV-Promotor und dem ENHA<sub>SV40</sub>-Element [254]. Folglich war auch der Immunisierungserfolg insgesamt eher

enttäuschend. Bei den Zytokinmessungen zeigten lediglich im IL-2-Test zwei der fünf mit pSP118-eKMP-11 immunisierten Mäuse eine erhöhte IL-2-Freisetzung, bei den restlichen 13 der insgesamt 15 untersuchten Tiere waren keine signifikanten Erhöhungen der IFN- $\gamma$ - und IL-2-Spiegel feststellbar [254]. Im Proliferationstest zeigten vier der 15 untersuchten Mäuse KMP-11-spezifische T-Zellen, doch war in drei von diesen Tieren auch die Immunantwort gegen hitzegetötete Listerien erhöht, so dass die Spezifität dieser Immunreaktion fraglich ist [254].

### **6.3 Die Baktofektion von APC mit *L. monocytogenes* ist ineffizient und langsam**

Dendritische Zellen besitzen eine Schlüsselrolle bei der Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen und der Induktion einer spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort [14,276,330]. Daher ist im Falle einer Vakzinierung mittels Baktofektion eine möglichst effektive Transformation dieses Zelltyps für die Erzeugung einer effektiven Immunantwort und damit eines Impfschutzes gegen das plasmidcodierte Antigen von zentraler Bedeutung [180,227,276]. Allerdings war der Prozentsatz transformierter DC nach Baktofektion mit Stamm S1 mit deutlich unter 1 % bedeutend geringer als z. B. bei epithelialen Zellen, obwohl DC sehr effizient Listerien phagozytieren [255] (Tabelle 5.2). Diese im Vergleich zu anderen Zelltypen schlechte Transformierbarkeit von DC wurde nicht nur bei der Baktofektion [119,120,140,255], sondern auch bei Verwendung anderer nichtviraler Transformationsverfahren wie z. B. der Lipofektion [8,205,320,344] beobachtet und wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass DC im Vergleich zu anderen Zelltypen über sehr effiziente Mechanismen verfügen, Fremd- bzw. Plasmid-DNA abzubauen [372].

Darüber hinaus führt die Baktofektion von DC erst nach über 12 h zu einer messbaren Expression von EGFP (Abbildungen 5.6 B und 5.17 B, Tabelle 5.2) [255]. Dies hat in zweifacher Hinsicht Konsequenzen auch *in vivo*: Erstens setzen die direkten zytotoxischen Effekte in APC nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* bereits sehr frühzeitig ein (Abbildung 5.6 C-E) [15,38,126,280]. So konnte insbesondere für murine DC gezeigt werden, dass LLO unabhängig von seiner zytolytischen Wirkung *in vitro* bereits innerhalb von 6 h in infizierten DC das Apoptoseprogramm auslösen kann [126]. Zweitens kommen zusätzlich zu diesen direkten zytotoxischen Effekten *in vivo* noch die indirekten hinzu wie insbesondere die CTL-vermittelte Abtötung infizierter und damit potentiell transformierter DC innerhalb der ersten 24 h nach Infektion [366].

Auch im Falle einer direkten bzw. indirekten Antigenpräsentation durch infizierte M $\Phi$  sind die Unterschiede in der Kinetik der zytotoxischen Effekte einerseits und der EGFP-Expression andererseits ausgeprägt. So kommt es beispielsweise bereits 5 min nach Kontakt von M $\Phi$  mit Listerien zu einem Anstieg der Konzentration an intrazellulärem Calcium [117] und infolge dessen auch zur Aktivierung einer Reihe von Signaltransduktionsprozessen, die Einfluss auf die Expression des heterologen Antigens haben können. Bereits 30 min nach Infektion ist in P388.D1-M $\Phi$  eine Aktivierung des Transkriptionsaktivators NF- $\kappa$ B beschrieben worden [136,211] sowie 45 min nach Infektion in J774.A1-M $\Phi$  eine Induktion des Hitzeschockproteins HSP70 als Anzeichen eines zellulären Stresses [295]. Darüber hinaus kam es in einer Monozytenzelllinie 3 h nach Infektion mit *L. monocytogenes* zu globalen Veränderungen des Transkriptom [49]. Schließlich sind *in vitro* 12 h

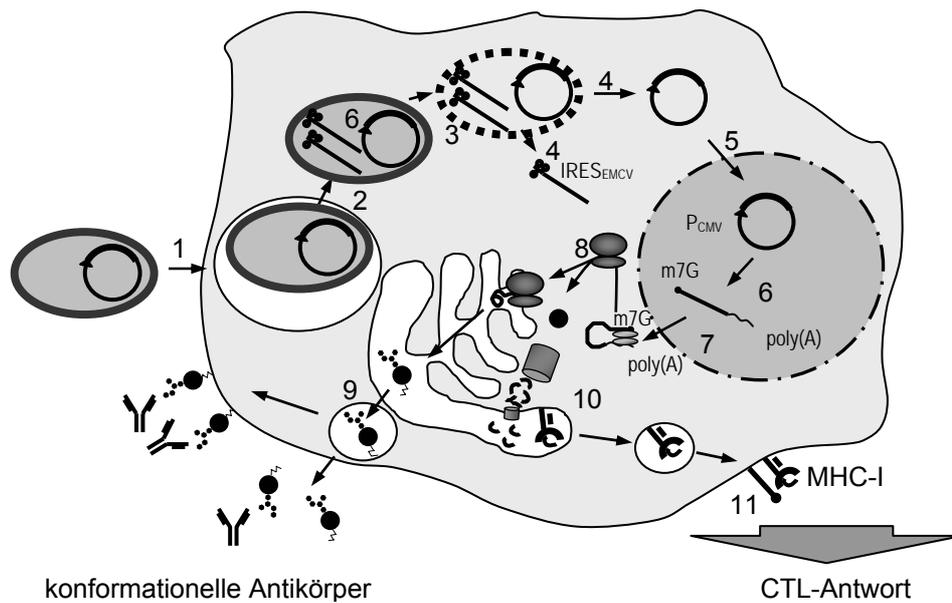
nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* fast  $\frac{3}{4}$  aller BMM $\Phi$  nekrotisch [15]. Innerhalb der ersten 24 h nach Infektion mit *L. monocytogenes* kommt es in infizierten Mäusen zu einer IFN- $\gamma$ -Produktion [326], wodurch infizierte M $\Phi$  aktiviert werden. Dies kann durch den Abbau der Trägerbakterien auch zu einem verminderten Transfer von Plasmid-DNA in den Zellkern führen. Da die in infizierten M $\Phi$  synthetisierten Antigene nach deren Nekrose von DC aufgenommen werden und über eine Kreuzpräsentation zum Priming spezifischer T-Zellen verwendet werden können, hat somit auch die Effizienz der Antigen synthese in M $\Phi$  einen wesentlichen Einfluss auf die Induktion einer spezifischen Immunität gegen das codierte heterologe Antigen.

Diese Unterschiede in den Kinetiken dürften im Falle der Übertragung von Proteinantigenen, die bereits in den Listerien synthetisiert werden und somit unmittelbar nach der Phagozytose zusammen mit den anderen listeriellen Proteinen zur Antigenprozessierung und -präsentation zur Verfügung stehen, keine Rolle spielen. Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, ist *L. monocytogenes* in der Tat bereits vielfach erfolgreich als Träger heterologer Antigene im Tiermodell eingesetzt worden (siehe Übersichtsartikel in [73,155,249,250]). Berichte zur erfolgreichen Übertragung von Plasmid-DNA sind demgegenüber sehr viel seltener und die erzielte Immunität nur zum Teil protektiv [224,314]. Im Falle der Baktofektion könnte es daher zu einer Art Wettlauf zwischen der Expression des codierten Antigens und den zytotoxischen Effekten kommen, so dass ein Teil der infizierten DC und M $\Phi$  zerstört wird, bevor sie das heterologe Antigen exprimieren und präsentieren können.

Eine Lösung für dieses Problem bietet die Beobachtung, dass der Import der Plasmid-DNA in den Kern ausdifferenzierter Zellen auch im Falle der Baktofektion mit *L. monocytogenes* einen limitierenden Faktor darstellt und zu einer Verzögerung der Antigenexpression führt. Daher würde anstelle von Plasmid-DNA die Übertragung von antigencodierender mRNA, die bereits in den Trägerbakterien transkribiert wird, einen Ausweg bieten, da diese nicht in den Zellkern importiert werden müsste und nach der Übertragung unmittelbar zur Translation im Zytoplasma der eukaryontischen Zelle zur Verfügung stünde (Abbildung 6.1). Für die Vakzinierung von besonderem Interesse ist dabei der Befund, dass *in vitro* die Übertragung von RNA in humane DC besonders effektiv [112,225,262] und der von Plasmid-DNA überlegen war [205,262,320]. Auch erzeugten in klinischen Phase-I-Studien autologe humane DC, die aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten isoliert und *ex vivo* mit mRNA transformiert wurden, die für ein Antigen des betreffenden Tumors codierte, nach Reapplikation in den Patienten eine potente zelluläre Immunantwort gegen den Ausgangstumor (Übersichtsartikel in [112,225,262]).

#### **6.4 Bakterielle Übertragung von mRNA auf Säugerzellen mittels *L. monocytogenes***

In der Vergangenheit wurden bereits eine Reihe von Methoden zur erfolgreichen Übertragung von antigencodierender RNA *in vitro* wie auch *in vivo* beschrieben worden (Übersichtsartikel in [112,142,262,274,286]). Die *in vivo*-Applikation der RNA erfolgte dabei meist mittels intramuskulärer [42,43,55,93,143,150,348,352,365], seltener über intravenöse [143] oder subkutane [143,352] Injektion oder mittels „GeneGun“ [210,271] von entweder nackten RNA-Molekülen [42,43,55,93,150,271,365], oder von RNA im Komplex mit kationischen Lipiden [143,204,214,376]



**Abbildung 6.1:** Vergleich der bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA (blau) mit der von mRNA (rot) (vergleiche auch Abbildung 2.3).

1) Invasion der Wirtszelle. 2) Freisetzung der Bakterien aus dem Phagosom. 3) Lyse der Bakterienzelle. 4) Freisetzung der Nukleinsäuren in das Zytoplasma der Wirtszelle. 5.) Import der Plasmid-DNA in den Zellkern. 6) Transkription des plasmidcodierten Antigens. 7) Export der prozessierten mRNA aus dem Zellkern. 8) Translation der mRNA am eukaryontischen Ribosom. 9) Posttranslationale Modifikationen im ER bei sezernierten Proteinen oder Membranproteinen. 10) Abbau des zytosomatischen Proteins im Proteasom und Transport der Peptide durch den TAP-Transporter in das ER sowie dort Beladung von MHC-I-Molekülen mit den abgeleiteten Peptiden/Epitopen. 11) Präsentation der Epitope im Kontext von MHC-I-Molekülen.

Im Gegensatz zur bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA setzt also bei der bakteriellen Übertragung von mRNA die Transkription (6) des Reportergens vor der Lyse der Bakterienzelle (4) ein. Es erfolgt eine Übertragung von mRNA, der Import von Plasmid-DNA in den Zellkern ist damit nicht erforderlich. Beiden gemeinsam ist die Translation der mRNA am eukaryontischen Ribosom.

bzw. kationischen Peptiden [20,143,352]. Daher waren sowohl *in vitro* als auch bei der Immunisierung *in vivo* mit nackter wie auch mit komplexierter RNA z. T. große Mengen (10-100 µg) an hoch aufgereinigter RNA notwendig [42,55,93,143,150,348,365]. Die Synthese der mRNA *in vitro* und ihre nachfolgende Aufreinigung sind aber zeitaufwendige und kostenintensive Verfahren [205]. Auch ist eine direkte orale Applikation der antigencodierenden RNA und somit die Erzeugung einer mukosalen Immunantwort, die einen unmittelbaren Schutz an der bevorzugten Eintrittspforte vieler Infektionserreger vermittelt [60,193], bisher nicht beschrieben worden.

Somit erscheint die Übertragung von antigencodierender RNA anstelle von Plasmid-DNA mittels *L. monocytogenes* besonders vielversprechend, da die direkte Synthese der antigenspezifischen mRNA durch die bakterielle Trägerzelle aufwendige Isolations- und Aufreinigungsschritte überflüssig machen würde. Da aber insbesondere nichttranslatierte mRNA-Moleküle in Prokaryonten im allgemeinen eine nur sehr kurze Halbwertszeit aufweisen in der Größenordnung von nur wenigen Minuten [123,273], müssten diese entweder speziell stabilisiert und damit vor Abbau durch prokaryontische Ribonukleasen geschützt werden [39], oder aber mit einer so hohen Syntheserate hergestellt werden,

dass diese den Abbau kinetisch kompensiert und somit eine ausreichend hohe Gleichgewichtskonzentration der zu übertragenden mRNA gewährleistet.

Um eine solch hohe Syntheserate zu gewährleisten, wurde auf ein T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem zurückgegriffen. Die T7-RNA-Polymerase ist ein monomeres Enzym, welches keine weiteren  $\sigma$ -Faktoren benötigt und eine sehr hohe Prozessivität besitzt sowie zusätzlich eine sehr hohe Spezifität für ihre zugehörigen Promotoren [64]. Dieses System wurde bereits in gramnegativen Bakterien wie *E. coli* [321,328] oder *S. typhi* [290] erfolgreich zur Expression großer Mengen heterologer Proteine eingesetzt. Ferner konnten mit einem derartigen T7-Expressionssystem in *E. coli* kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle hergestellt werden, die in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* nach Aufnahme der sie enthaltenden *E. coli*-Zellen ein als RNA-Interferenz [218] bekannten Vorgang auszulösen vermochten [333,334]. Aufbauend auf Ergebnissen in grampositiven Mikroorganismen wie *B. subtilis* [54] und *L. lactis* [355] wurde daher wie in den Abschnitten 4.6.2 und 5.3.1 näher beschrieben ein auf zwei Plasmiden beruhenden T7-Expressionssystem für *L. monocytogenes* entworfen. Durch Konstruktion einer Reihe von Kontrollstämmen, die jeweils Plasmide tragen, denen ein genetisches Element des T7-Transkriptionssystems fehlte, konnte gezeigt werden, dass dieses System in *L. monocytogenes* nicht nur sehr effektiv, sondern auch hoch spezifisch funktioniert. Mit Hilfe von Stamm S15, der die beiden Plasmide pCSA1 und pCSB1 trägt, gelang so schließlich die bakterielle Übertragung von *egfp*-mRNA auf eine Reihe verschiedener Zelltypen (Abbildungen 5.14 und 5.17, Tabelle 5.3). Die Bedeutung der einzelnen Faktoren für den Übertragungsprozess soll im Folgenden noch näher diskutiert werden.

Für die erfolgreiche Übertragung von *egfp*-mRNA auf eukaryontische Wirtszellen war das T7-Transkriptionssystem von ausschlaggebender Bedeutung. Nur die Infektion von Caco-2-Zellen mit Stamm S15, nicht aber mit einem der Kontrollstämme S22, S23 oder S31 führte zu einer messbaren EGFP-Expression durch infizierte Caco-2-Zellen (Abbildung 5.15). Auch hier führte die Transkription der zu übertragenden mRNA direkt durch die listerielle RNA-Polymerase zu einer drastischen Herabsetzung der Anzahl EGFP-exprimierender Caco-2-Zellen, was die Bedeutung einer hohen RNA-Konzentration in der Bakterienzelle unterstreicht.

Um nach Lyse der Bakterienzelle und Freisetzung der mRNA in das Zytoplasma der infizierten Zelle eine effiziente Translation des Reportergens zu gewährleisten, wurde dieses an seinem 5'-Ende mit dem IRES-Element des EMC-Virus genetisch fusioniert. Eukaryontische mRNAs werden im Zellkern durch Hinzufügen eines 7-Methylguanosinrestes am 5'-Ende sowie durch einen bis zu 300 Nukleotiden langen Polyadenintrakt an ihrem 3'-Ende posttranskriptionell modifiziert [200]. Beide Strukturen interagieren miteinander und sind zusammen für eine effiziente Translation am eukaryontischen Ribosom notwendig [105]. Das Picornavirus EMCV besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom und repliziert sich im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle [283]. Da dieses nicht in den Kern der infizierten Zelle importiert wird, werden die 5'- und 3'-Enden auch nicht entsprechend modifiziert. Um dennoch die Translation der viruscodierten Proteine sicher zu stellen, besitzt die virale RNA am 5'-Ende einen sekundärstruktureichen, ca. 500 Bp langen Abschnitt, der es dem RNA-Molekül

erlaubt, auch unabhängig von einem 7-Methylguanosinrest an seinem 5'-Ende effizient an Ribosomen zu binden und somit die Translation einzuleiten [292]. Wie in Abbildung 5.15 zu erkennen, war die EGFP-Expression in Caco-2-Zellen nicht nur von der effizienten Transkription der *egfp*-mRNA vom T7-Promotor durch die T7-RNA-Polymerase in der Bakterienzelle abhängig (S23 und S31), sondern auch von dem IRES<sub>EMCV</sub>-Element am 5'-Ende des *egfp*-Transkripts (S25). Die fehlende EGFP-Expression von Caco-2-Zellen nach Infektion mit Stamm S25 legt die Schlussfolgerung nahe, dass weder RNA selbst noch Plasmid-DNA in den Zellkern importiert wurde. Gegen die Synthese von *egfp*-mRNA im Zellkern der Caco-2-Zellen nach Infektion mit Stamm S15 spricht auch die Beobachtung, dass das Anheften eines 7-Methylguanosinrestes am 5'-Ende der mRNA die IRES-abhängige Translation unterdrückt [130]. Dies könnte auch eine Ursache der fehlenden EGFP-Expression nach Infektion mit Stamm S37 sein, da hier durch den CMV-Promotor zwar im Zellkern eine *egfp*-mRNA synthetisiert werden könnte, diese aber ein IRES<sub>EMCV</sub>-Element enthält und somit nach Anheften eines 7-Methylguanosinrestes am 5'-Ende möglicherweise nicht translatierbar wäre.

Bemerkenswerterweise ist die Translationsinitiation von IRES-Elementen insbesondere unter Stressbedingungen, wie sie nach Infektion mit intrazellulären Erregern wie z. B. *L. monocytogenes* zu beobachten sind [216,295,296], effizienter als die von konventionellen, d. h. prozessierten mRNAs [84]. Wahrscheinlich spielt hier die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen und infolge dessen die Phosphorylierung zahlreicher Translationsfaktoren, die zur Translationsinitiation von prozessierten mRNAs, nicht aber zur Translationsinitiation von IRES-Elementen benötigt werden, eine gewisse Rolle, da diese zu einer Reduktion der zelleigenen Proteinbiosynthese führt [6,45]. Darüber hinaus haben ausgeprägte Sekundärstrukturen im 5'-Bereich von mRNA-Molekülen in dem zu *L. monocytogenes* verwandten Bakterium *B. subtilis* einen stabilisierenden Effekt auf die betreffende mRNA [131] und insbesondere auch auf nichttranslatierbare und daher besonders instabile RNAs [297]. Somit hätte das IRES<sub>EMCV</sub>-Element eine zweifache Rolle, weil es nicht nur die effiziente Translation des Reportergens auch unter Stressbedingungen in der infizierten Wirtszelle ermöglicht, sondern auch der RNA eine gesteigerte Stabilität gegenüber dem Abbau in der bakteriellen Zelle verleiht.

Neben der 7-Methylguanosinkappe am 5'-Ende hat wie bereits erwähnt auch der homopolymere Trakt von durchschnittlich 250 Adeninresten am 3'-Terminus einen großen Einfluss auf die Stärke der Translation [105] wie auch der Stabilität [226] einer eukaryontischen mRNA. Obwohl ein solcher Poly-A-Trakt auch die IRES<sub>EMCV</sub>-abhängige Translation *in vitro* um den Faktor 3 verstärken kann [17], führt dieser in *E. coli* [129,241,370] und vielen anderen Eubakterien [37] anders als in Eukaryonten zu einem beschleunigten Abbau und damit zu einer Destabilisierung der mRNA. Um den Einfluss eines Poly-A-Traktes am 3'-Ende der *egfp*-mRNA auf die Stärke der frühen, IRES<sub>EMCV</sub>-abhängigen EGFP-Expression zu untersuchen, wurde Plasmid pCSB5 und Stamm S63 hergestellt. Aufgrund der Instabilität von Plasmiden mit langen homopolymeren Abschnitten in *E. coli* war die Länge des Poly-A-Traktes in pCSB5 auf 98 Adeninreste begrenzt [268]. Wie anhand von Abbildung 5.19 zu erkennen, war in Caco-2-Zellen, nicht jedoch in den beiden professionell-phagozytischen Zelllinien eine verstärkte EGFP-Expression nachweisbar. Da EMCV als mauspathogener Virus nicht an eine

Replikation in humanen Zellen wie Caco-2-Zellen adaptiert ist, könnte hier der Poly-A-Trakt noch eine translationsverstärkende Wirkung haben. In der Tat bewirkt ein zusätzlicher Poly-A-Trakt nach Lipofektion von mRNAs eine bis zu 3fach höhere Reporterexpression in humanen HeLa-Zellen im Vergleich zu einer Translation allein unter der Kontrolle des IRES<sub>EMCV</sub>. In murinen Zelllinien dürfte hingegen die Proteinexpression allein unter dem IRES<sub>EMCV</sub> bereits optimal und eine weitere Steigerung daher so nicht möglich sein.

Ebenso wie bereits für die Baktinfektion gezeigt werden konnte, führt die Expression des Phagenlysin auch bei der bakteriellen Übertragung von mRNA zu einer gesteigerten Anzahl EGFP-exprimierender Zellen (Abbildungen 5.15). Obwohl sowohl das *ply118*- als auch das *polT7*-Gen von *P<sub>actA</sub>* aus transkribiert werden, ist die lysinvermittelte Permeabilisierung der bakteriellen Zellwand offensichtlich langsam genug [255], um die Synthese ausreichender Mengen an *egfp*-mRNA durch PolT7 noch vor der kompletten Lyse der Bakterienzelle im Zytoplasma der Wirtszelle zu erlauben. Umgekehrt ist die gesteigerte Anzahl an EGFP-exprimierenden Wirtszellen nach Infektion mit Ply118-exprimierenden Trägerstämmen ein weiterer Beleg dafür, dass die beobachtete EGFP-Expression auf die Freisetzung von diffusibler *egfp*-mRNA aus lysierten Bakterienzellen zurückzuführen ist.

Eine weitere Bestätigung dafür, dass die beobachtete EGFP-Expression durch die infizierten Zellen auf die unmittelbare Translation von mRNA zurückzuführen ist, die in den Bakterienzellen synthetisiert und nach ihrer Lyse aus diesen freigesetzt wurde, ergaben Versuche mit eukaryontischen Transkriptions- bzw. Translationsinhibitoren (Abbildung 5.16). So ist Cycloheximid ein spezifischer Inhibitor der eukaryontischen, nicht jedoch der prokaryontischen Translation [239],  $\alpha$ -Amanitin inhibiert in der verwendeten niedrigen Konzentration ausschließlich die eukaryontische RNA-Polymerase II, nicht jedoch andere eukaryontische sowie prokaryontische RNA-Polymerasen [197,308]. Die Beobachtung, dass die EGFP-Expression in Caco-2-Zellen nach Infektion mit Stamm S15 zwar durch Cycloheximid, nicht jedoch durch  $\alpha$ -Amanitin inhibierbar war, zeigt somit, dass die beobachtete EGFP-Expression nicht durch einen Kotransport der Plasmid-DNA in den Zellkern und Transkription durch die eukaryontische RNA-Polymerase II hervorgerufen wird und dass die Translation der *egfp*-mRNA auch erst am eukaryontischen und nicht schon am prokaryontischen Ribosom stattfindet.

Wie bereits ausgeführt, ist die Anzahl an EGFP-exprimierenden Zellen nach Baktinfektion mit Stamm S1 bzw. S70 infolge des Zusammenbruchs der Kernmembran während der Mitose und des dadurch ermöglichten Zutritts der Plasmid-DNA zum nukleären Kompartiment abhängig von der Anzahl der sich teilenden Zellen (Abbildungen 5.9 und 5.16). Im Gegensatz dazu ändert sich die Anzahl EGFP-exprimierender infizierter Zellen nach Infektion mit Stamm S68 durch eine Vorbehandlung mit Thymidin nicht und somit ist die beobachtete EGFP-Expression auch nicht auf eine Übertragung von Plasmid-DNA, sondern von *egfp*-codierender mRNA aus lysierten Bakterienzellen zurückzuführen.

Die Menge an freigesetzter und in den Wirtszellen translatierter *egfp*-mRNA variiert nicht nur zwischen Zellen des selben Typs, sondern auch besonders zwischen Zellen verschiedener Zelltypen. So hatten zwar sowohl im Falle der bakteriellen Übertragung von Plasmid-DNA durch die Stämme S1 bzw. S70

(Tabelle 5.2) wie auch im Falle der Übertragung von mRNA durch die entsprechenden Stämme S15 und S68 (Tabelle 5.3) ein großer Teil der professionell-phagozytischen Zellen Bakterien aufgenommen, aber in beiden Fällen exprimierten nur ein sehr geringer Prozentsatz an Zellen EGFP. Im Gegensatz dazu war zwar der Anteil infizierter Zellen im Falle der nicht-professionell phagozytischen Zellen niedriger, aber die Transformationseffizienz war hier wesentlich höher als bei den phagozytischen Zellen. Im Falle der Übertragung von mRNA könnte dies zum einen auf eine unterschiedlich effiziente Lyse der Bakterien im phagosomalen oder zytoplasmatischen Kompartiment der infizierten Zelle sowie auf eine unterschiedliche Stabilität der freigesetzten mRNA-Moleküle in den verschiedenen Zelltypen zurückzuführen sein. Ferner ist die Stärke der IRES-abhängigen Expression je nach IRES-Element vom Zelltyp abhängig [25]. In jedem Falle jedoch war die Transformationseffizienz nach Übertragung von mRNA in allen untersuchten Zelltypen deutlich höher als die nach Übertragung von Plasmid-DNA, insbesondere zu frühen Zeitpunkten.

Bemerkenswerterweise exprimierten auch bis zu 10 % der hmoDC 4 h nach Übertragung von *egfp*-mRNA durch Infektion mit Stamm S15 EGFP (Abbildung 5.17). Die Expressionsrate lag dabei deutlich über den Werten, die bislang nach bakterieller Übertragung von Plasmid-DNA gemessen wurden [120,140,255]. Das Ergebnis des Vergleichs der bakteriellen Übertragung von mRNA und Plasmid-DNA hinsichtlich der Anzahl transformierter hmoDC *in vitro* ist auch in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen eines sehr ähnlichen Vergleichs, bei dem die Effizienz der Lipofektion von hmoDC mit mRNA mit der von Plasmid-DNA verglichen wurde [205,320]. Auch hier zeigte sich *in vitro* nach Übertragung von mRNA eine im Vergleich zu Plasmid-DNA bis zu viermal höhere Ausbeute an EGFP-exprimierenden hmoDC [320]. Somit scheint zumindest in hmoDC die nichtvirale Übertragung von RNA der von Plasmid-DNA generell überlegen zu sein. Da aber DC für die Erzeugung einer T-Zellimmunität die wichtigsten APC darstellen [13,14,180,276], hat dies auch wichtige Implikationen für die Vakzineentwicklung im allgemeinen [2,21].

Da die Stärke der Expression je nach IRES-Element auch von der codierten Sequenz abhängen kann [139] und um neben der Antigenexpression auch die Antigenpräsentation zu untersuchen, wurde als ein weiteres Reportergen ein Fragment des Ovalbumingens *ova<sub>cyt</sub>* in Form von Plasmid pCSB7 bzw. Stamm S62N eingesetzt. Durch Verwendung entsprechender T-Zell-Klone ließ sich so neben der Expression auch die *in vitro*-Prozessierung und -Präsentation eines von OVA<sub>cyt</sub> abgeleiteten CD8-Epitops nachweisen [108]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur EGFP-Expression in antigenpräsentierenden Zellen (Abbildung 5.17) war auch die Antigenpräsentation durch infizierte IC21-Makrophagen 4 h nach Übertragung von *ova<sub>cyt</sub>*-mRNA durch Stamm S62N deutlich stärker als nach Übertragung von OVA<sub>cyt</sub>-codierender Plasmid-DNA mit Stamm DL-2. Somit führt zu einem bereits frühen Zeitpunkt nach Infektion die bakterielle Übertragung von mRNA *in vitro* nicht nur zu einer stärkeren Antigenexpression, sondern auch zu einer effizienteren MHC-I-abhängigen Antigenpräsentation als die Übertragung von Plasmid-DNA [320].

Diese *in vitro*-Befunde werden auch durch entsprechende *in vivo*-Ergebnisse unterstützt. So konnte durch adoptive Transfer-Experimente [284] gezeigt werden, dass es nach Infektion von BALB/c-

Mäusen mit Stamm S62N zu einer sehr viel effektiveren MHC-I-Antigenpräsentation des OVA<sub>cyt</sub>-abgeleiteten CD8-Epitops kommt als nach Infektion mit Stamm DL-2, bei dem allenfalls eine sehr schwache MHC-I-Antigenpräsentation nachweisbar war (D. Löffler, in Vorbereitung).

Allerdings stehen der im Vergleich zur Übertragung von Plasmid-DNA *in vitro* wie auch *in vivo* gesteigerten Transformationseffizienz nach Übertragung von mRNA eine reduzierte Fitness der Trägerstämme gegenüber. Wie in der Abbildung 5.20 zu erkennen ist, waren im Vergleich zu den Stämmen S1 und S13 sowohl die Wachstumsrate in BHI als auch die Invasionsrate in Caco-2-Zellen bei Stamm S15 deutlich erniedrigt. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Synthese großer Mengen an nicht-translatierter mRNA durch das plasmidbasierte T7-Expressionssystem eine erhebliche metabolische Belastung für die Bakterienzellen darstellt. Ferner zeigt ein Vergleich der entsprechenden Werte in den Tabellen 5.2 und 5.3, dass im Vergleich mit Stamm S54 die Anzahl infizierter Zellen nach Infektion mit Stamm S67 in drei der vier getesteten Zelllinien deutlich erniedrigt war. Diese reduzierte Fitness spiegelt sich auch in einer deutlichen Attenuation von Stamm S62N nach *i. v.*-Infektion von BALB/c-Mäusen wider (Daniela Löffler, in Vorbereitung).

## 6.5 Ausblick

Die bakterielle Übertragung von antigencodierender mRNA anstelle von Plasmid-DNA mit Hilfe virulenzattenuierter *L. monocytogenes* bietet somit für die Anwendung als Vakzinierungsmethode neben den in Abschnitten 2.8 und 2.10 genannten Vorteilen eine Reihe von weiteren praktischen Vorzügen:

1. Aufgrund der geringeren Größe und der größeren Menge ist die Freisetzung der mRNA aus den Bakterien nach ihrer Lyse möglicherweise effizienter als die von Plasmid-DNA.
2. Da kein Kernimport von Plasmid-DNA benötigt wird, kann die Synthese des codierten Antigens mehr oder minder unmittelbar nach Infektion der antigenpräsentierenden Zelle einsetzen.
3. Da keine eukaryontischen Promotoren auf den Plasmiden des T7-Expressionssystems vorhanden sind, kann es auch nicht zu einer unbeabsichtigten Transkription von zellulären (Proto-)Onkogenen [128] z. B. infolge zufälliger Integration der Plasmide in das Genom der antigenpräsentierenden Zelle [72,350] kommen.
4. Das Risiko einer Plasmidintegration in das Wirtszellgenom ließe sich durch die Integration des T7-Expressionssystems in das Genom der bakteriellen Trägerzelle [290] vollständig unterbinden. Somit wären im Gegensatz zur Baktofektion für die Übertragung von antigencodierender mRNA keinerlei Plasmide notwendig mit der Konsequenz, dass somit auch auf den problematischen Einsatz von Antibiotikumresistenzgenen verzichtet werden könnte [1].
5. Die *in vitro* beobachtete hohe Effizienz der bakteriellen Übertragung von mRNA auf antigenpräsentierende Zellen führt auch *in vivo* zu einer effizienten MHC-I-restringierten Antigenpräsentation (Daniela Löffler, in Vorbereitung).

6. Im Gegensatz zur Immunisierung mit nackter mRNA erlaubt deren bakterielle Übertragung mittels *L. monocytogenes* auch eine orale Applikation und damit die Erzeugung einer mukosalen Immunität.
7. Darüber hinaus sind die *in vitro*-Synthese wie auch die nachfolgende Aufreinigung der antigencodierenden RNA zeitaufwendige und kostspielige Prozesse, die durch die unmittelbare Übertragung translationskompetenter RNA auf die eukaryontische Zielzelle entfallen.
8. Da sich *L. monocytogenes* wie andere Bakterien auch nach *i. v.*-Applikation bevorzugt in Tumorgeweben anreichert [373], könnte das hier vorgestellte Verfahren *in vivo* auch zur Übertragung von antisense-RNA [174] in Tumorthérapien verwendet werden.
9. In Verbindung mit der Expression von spezifischen Liganden auf der Oberfläche der Trägerbakterien ließe sich somit RNA *in vivo* auch gezielt in bestimmte Tumorzelltypen einbringen.
10. Auch könnte dadurch eine frühzeitige Antigenpräsentation und Aktivierung spezifischer T-Zellen ermöglicht werden, was für die Erzeugung einer protektiven Immunantwort und eines immunologischen Gedächtnisses von großer Bedeutung ist [56,190,223].

Immunisierungsversuche in geeigneten Tiermodellen werden zeigen, ob die hier vorgestellte Strategie der Übertragung antigencodierender mRNA mit Hilfe von *L. monocytogenes* auch tatsächlich zu einer effizienten, d. h. protektiven Immunität führt, die sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort umfasst und auch an den Schleimhäuten wirksam ist.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Anonymous** (1998) *Points to consider on plasmid DNA vaccines for preventive infectious disease indications*. Food and Drug Administration, Washington, D. C.
2. **Ahmed R., J. B. Lanier and E. G. Pamer** (2002) Immunological memory and infection. p. 175-189. In S. H. Kaufmann, A. Sher and R. Ahmed (eds), *Immunology of infectious diseases*. ASM Press, Washington.
3. **Albert M. L., B. Sauter and N. Bhardwaj** (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**: 86-9.
4. **Alvarez-Dominguez C., E. Carrasco-Marin and F. Leyva-Cobian** (1993) Role of complement component C1q in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophage-like cell lines. *Infect Immun* **61**: 3664-72.
5. **Amara R. R., F. Villinger, J. D. Altman, S. L. Lydy, S. P. O'Neil, S. I. Staprans, D. C. Montefiori, Y. Xu, J. G. Herndon, L. S. Wyatt, M. A. Candido, N. L. Kozyr, P. L. Earl, J. M. Smith, H. L. Ma, B. D. Grimm, M. L. Hulsey, J. Miller, H. M. McClure, J. M. McNicholl, B. Moss and H. L. Robinson** (2001) Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* **292**: 69-74.
6. **Anderson P. and N. Kedersha** (2002) Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* **7**: 213-21.
7. **Angelakopoulos H., K. Loock, D. M. Sisul, E. R. Jensen, J. F. Miller and E. L. Hohmann** (2002) Safety and shedding of an attenuated strain of *Listeria monocytogenes* with a deletion of actA/plcB in adult volunteers: a dose escalation study of oral inoculation. *Infect Immun* **70**: 3592-601.
8. **Arthur J. F., L. H. Butterfield, M. D. Roth, L. A. Bui, S. M. Kiertscher, R. Lau, S. Dubinett, J. Glaspy, W. H. McBride and J. S. Economou** (1997) A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther* **4**: 17-25.
9. **Aureli P., G. C. Fiorucci, D. Caroli, G. Marchiaro, O. Novara, L. Leone and S. Salmaso** (2000) An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med* **342**: 1236-41.
10. **Bacher A., K. Griehl, S. Mackamul, R. Mitreiter, H. Muckter and Y. Ben-Shaul** (1992) Protease inhibitors suppress the formation of tight junctions in gastrointestinal cell lines. *Exp Cell Res* **200**: 97-104.
11. **Badovinac V. P., B. B. Porter and J. T. Harty** (2002) Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* **3**: 619-26.
12. **Baldwin D. N., V. Vanchinathan, P. O. Brown and J. A. Theriot** (2003) A gene-expression program reflecting the innate immune response of cultured intestinal epithelial cells to infection by *Listeria monocytogenes*. *Genome Biol* **4**: R2.
13. **Banchereau J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka** (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
14. **Banchereau J. and R. M. Steinman** (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**: 245-52.
15. **Barsig J. and S. H. Kaufmann** (1997) The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. *Infect Immun* **65**: 4075-81.
16. **Berg R. E., E. Crossley, S. Murray and J. Forman** (2003) Memory CD8+ T cells provide innate immune protection against *Listeria monocytogenes* in the absence of cognate antigen. *J Exp Med* **198**: 1583-93.

17. **Bergamini G., T. Preiss and M. W. Hentze** (2000) Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *Rna* **6**: 1781-90.
18. **Bergmann B., D. Raffelsbauer, M. Kuhn, M. Goetz, S. Hom and W. Goebel** (2002) InIA- but not InIB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Mol Microbiol* **43**: 557-70.
19. **Bernhard K., H. Schrempf and W. Goebel** (1978) Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **133**: 897-903.
20. **Bettinger T., R. C. Carlisle, M. L. Read, M. Ogris and L. W. Seymour** (2001) Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells. *NAR* **29**: 3882-91.
21. **Bhardwaj N.** (2001) Processing and presentation of antigens by dendritic cells: implications for vaccines. *Trends Mol Med* **7**: 388-94.
22. **Bohne W., J. Heesemann and U. Gross** (1993) Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun* **61**: 1141-5.
23. **Bolhuis A., H. Tjalsma, H. E. Smith, A. de Jong, R. Meima, G. Venema, S. Bron and J. M. van Dijk** (1999) Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2934-41.
24. **Bootsma D., L. Budke and O. Vos** (1964) Studies on synchronous division of tissue culture cells initiated by excess thymidine. *Exp Cell Res* **33**: 301-9.
25. **Borman A. M., P. Le Mercier, M. Girard and K. M. Kean** (1997) Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *NAR* **25**: 925-32.
26. **Bouwer H. G., H. Shen, X. Fan, J. F. Miller, R. A. Barry and D. J. Hinrichs** (1999) Existing antilisterial immunity does not inhibit the development of a *Listeria monocytogenes*-specific primary cytotoxic T-lymphocyte response. *Infect Immun* **67**: 253-8.
27. **Boyer J. D., T. M. Robinson, P. C. Maciag, X. Peng, R. S. Johnson, G. Pavlakis, M. G. Lewis, A. Shen, R. Siliciano, C. R. Brown, D. B. Weiner and Y. Paterson** (2005) DNA prime *Listeria* boost induces a cellular immune response to SIV antigens in the rhesus macaque model that is capable of limited suppression of SIV239 viral replication. *Virology* **333**: 88-101.
28. **Braun L., H. Ohayon and P. Cossart** (1998) The InIB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol* **27**: 1077-87.
29. **Brisson M., W. C. Tseng, C. Almonte, S. Watkins and L. Huang** (1999) Subcellular trafficking of the cytoplasmic expression system. *Hum Gene Ther* **10**: 2601-13.
30. **Brunner S., T. Sauer, S. Carotta, M. Cotten, M. Saltik and E. Wagner** (2000) Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther* **7**: 401-7.
31. **Brzoza K. L., A. B. Rockel and E. M. Hiltbold** (2004) Cytoplasmic entry of *Listeria monocytogenes* enhances dendritic cell maturation and T cell differentiation and function. *J Immunol* **173**: 2641-51.
32. **Bubert A., Z. Sokolovic, S. K. Chun, L. Papatheodorou, A. Simm and W. Goebel** (1999) Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. *Mol Gen Genet* **261**: 323-36.
33. **Buchmeier N. A. and R. D. Schreiber** (1985) Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *P N A S USA* **82**: 7404-8.
34. **Butel J. S. and J. A. Lednicky** (1999) Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst* **91**: 119-34.
35. **Cabanes D., P. Dehoux, O. Dussurget, L. Frangeul and P. Cossart** (2002) Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol* **10**: 238-45.

36. **Cano F., H. Plotnicky-Gilquin, T. N. Nguyen, S. Liljeqvist, P. Samuelson, J. Bonnefoy, S. Stahl and A. Robert** (2000) Partial protection to respiratory syncytial virus (RSV) elicited in mice by intranasal immunization using live staphylococci with surface-displayed RSV-peptides. *Vaccine* **18**: 2743-52.
37. **Carpousis A. J., N. F. Vanzo and L. C. Raynal** (1999) mRNA degradation. A tale of poly(A) and multiprotein machines. *Trends Genet* **15**: 24-8.
38. **Carrero J. A., B. Calderon and E. R. Unanue** (2004) Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *J Immunol* **172**: 4866-74.
39. **Carrier T. A. and J. D. Keasling** (1997) Controlling messenger RNA stability in bacteria: strategies for engineering gene expression. *Biotechnol Prog* **13**: 699-708.
40. **Chalfie M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-5.
41. **Chen R. T.** (1999) Safety of vaccines. p. 144-1165. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
42. **Cheng W. F., C. F. Hung, K. F. Hsu, C. Y. Chai, L. He, M. Ling, L. A. Slater, R. B. Roden and T. C. Wu** (2001) Enhancement of sindbis virus self-replicating RNA vaccine potency by targeting antigen to endosomal/lysosomal compartments. *Hum Gene Ther* **12**: 235-52.
43. **Cheng W. F., C. F. Hung, C. N. Lee, Y. N. Su, M. C. Chang, L. He, T. C. Wu, C. A. Chen and C. Y. Hsieh** (2004) Naked RNA vaccine controls tumors with down-regulated MHC class I expression through NK cells and perforin-dependent pathways. *Eur J Immunol* **34**: 1892-900.
44. **Chico-Calero I., M. Suarez, B. Gonzalez-Zorn, M. Scotti, J. Slaghuis, W. Goebel and J. A. Vazquez-Boland** (2002) Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *P N A S USA* **99**: 431-6.
45. **Clemens M. J.** (2001) Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Prog Mol Subcell Biol* **27**: 57-89.
46. **Clotet B.** (2004) Strategies for overcoming resistance in HIV-1 infected patients receiving HAART. *AIDS Rev* **6**: 123-30.
47. **Coccia E. M., E. Stellacci, R. Orsatti, E. Benedetti, E. Giacomini, G. Marziali, B. C. Valdez and A. Battistini** (2002) Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT)-1 (PIAS-1) regulates the IFN-gamma response in macrophage cell lines. *Cell Signal* **14**: 537-45.
48. **Cochi S. L., H. F. Hull, R. W. Sutter, C. M. Wilfert and S. L. Katz** (1997) Commentary: the unfolding story of global poliomyelitis eradication. *J Infect Dis* **175**: S1-3.
49. **Cohen P., M. Bouaboula, M. Bellis, V. Baron, O. Jbilo, C. Poinot-Chazel, S. Galiegue, E. H. Hadibi and P. Casellas** (2000) Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays. *J Biol Chem* **275**: 11181-90.
50. **Coleman A. E., S. T. Forest, N. McNeil, A. L. Kovalchuk, T. Ried and S. Janz** (1999) Cytogenetic analysis of the bipotential murine pre-B cell lymphoma, P388, and its derivative macrophage-like tumor, P388D1, using SKY and CGH. *Leukemia* **13**: 1592-600.
51. **Conlan J. W.** (1996) Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen. *J Med Microbiol* **44**: 295-302.
52. **Conlan J. W. and R. J. North** (1992) Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect Immun* **60**: 5164-71.
53. **Conlan J. W. and R. J. North** (1991) Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J Exp Med* **174**: 741-4.
54. **Conrad B., R. S. Savchenko, R. Breves and J. Hofemeister** (1996) A T7 promoter-specific, inducible protein expression system for *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **250**: 230-6.

55. **Conry R. M., A. F. LoBuglio, M. Wright, L. Sumerel, M. J. Pike, F. Johanning, R. Benjamin, D. Lu and D. T. Curiel** (1995) Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res* **55**: 1397-400.
56. **Corbin G. A. and J. T. Harty** (2004) Duration of infection and antigen display have minimal influence on the kinetics of the CD4+ T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **173**: 5679-87.
57. **Cormack B. P., R. H. Valdivia and S. Falkow** (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-8.
58. **Cossart P., J. Pizarro-Cerda and M. Lecuit** (2003) Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* **13**: 23-31.
59. **Courvalin P., S. Goussard and C. Grillot-Courvalin** (1995) Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C R Acad Sci III* **318**: 1207-12.
60. **Cripps A. W., J. M. Kyd and A. R. Foxwell** (2001) Vaccines and mucosal immunisation. *Vaccine* **19**: 2513-5.
61. **Daniels J. J., I. B. Autenrieth and W. Goebel** (2000) Interaction of *Listeria monocytogenes* with the intestinal epithelium. *FEMS Microbiol Lett* **190**: 323-8.
62. **Darji A., C. A. Guzman, B. Gerstel, P. Wachholz, K. N. Timmis, J. Wehland, T. Chakraborty and S. Weiss** (1997) Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* **91**: 765-75.
63. **Darji A., W. Mohamed, E. Domann and T. Chakraborty** (2003) Induction of immune responses by attenuated isogenic mutant strains of *Listeria monocytogenes*. *Vaccine* **21**: S102-9.
64. **Davanloo P., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and F. W. Studier** (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *P N A S USA* **81**: 2035-9.
65. **Dean D. A.** (1997) Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp Cell Res* **230**: 293-302.
66. **Dean D. A., B. S. Dean, S. Muller and L. C. Smith** (1999) Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp Cell Res* **253**: 713-22.
67. **Demuth A., W. Goebel, H. U. Beuscher and M. Kuhn** (1996) Differential regulation of cytokine and cytokine receptor mRNA expression upon infection of bone marrow-derived macrophages with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **64**: 3475-83.
68. **Devico A. L., T. R. Fouts, M. T. Shata, R. Kamin-Lewis, G. K. Lewis and D. M. Hone** (2002) Development of an oral prime-boost strategy to elicit broadly neutralizing antibodies against HIV-1. *Vaccine* **20**: 1968-74.
69. **Dhar G., K. F. Faull and O. Schneewind** (2000) Anchor structure of cell wall surface proteins in *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry* **39**: 3725-33.
70. **Di Fabio S., D. Medaglini, C. M. Rush, F. Corrias, G. L. Panzini, M. Pace, P. Verani, G. Pozzi and F. Titti** (1998) Vaginal immunization of Cynomolgus monkeys with *Streptococcus gordonii* expressing HIV-1 and HPV 16 antigens. *Vaccine* **16**: 485-92.
71. **Dietrich G.** (1998). *Entwicklung neuer potentieller Lebendvakzine auf der Basis attenuierter Salmonella- und Listeria-Stämme*. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
72. **Dietrich G., A. Bubert, I. Gentshev, Z. Sokolovic, A. Simm, A. Catic, S. H. Kaufmann, J. Hess, A. A. Szalay and W. Goebel** (1998) Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat Biotechnol* **16**: 181-5.
73. **Dietrich G., I. Gentshev and W. Goebel** (2002) Delivery of protein antigens and DNA vaccines by *Listeria monocytogenes*. p. 263-288. In G. Dietrich and W. Goebel (eds), *Vaccine delivery strategies*. Horizon Scientific Press, Wymondham.
74. **Dietrich G., S. Spreng, D. Favre, J. F. Viret and C. A. Guzman** (2003) Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines. *Curr Opin Mol Ther* **5**: 10-9.

75. **Dopf J. and T. M. Horiagon** (1996) Deletion mapping of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* **173**: 39-44.
76. **Drevets D. A.** (1999) Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. *Infect Immun* **67**: 3512-7.
77. **Drevets D. A. and 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**: 2645-52.
78. **Dunne D. W., D. Resnick, J. Greenberg, M. Krieger and K. A. Joiner** (1994) The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *P N A S USA* **91**: 1863-7.
79. **Dye C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania and M. C. Raviglione** (1999) Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama* **282**: 677-86.
80. **Edelson B. T., P. Cossart and E. R. Unanue** (1999) Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection. *J Immunol* **163**: 4087-90.
81. **Edelson B. T. and E. R. Unanue** (2000) Immunity to *Listeria* infection. *Curr Opin Immunol* **12**: 425-31.
82. **Edelson B. T. and E. R. Unanue** (2001) Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity* **14**: 503-12.
83. **Ellis R. W.** (2001) Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. *Vaccine* **19**: 2681-7.
84. **Elroy-Stein O., T. R. Fuerst and B. Moss** (1989) Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *P N A S USA* **86**: 6126-30.
85. **Engelbrecht F., S. K. Chun, C. Ochs, J. Hess, F. Lottspeich, W. Goebel and 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**: 823-37.
86. **Escriou V., M. Carriere, F. Bussone, P. Wils and D. Scherman** (2001) Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. *J Gene Med* **3**: 179-87.
87. **Fasbender A., J. Zabner, B. G. Zeiher and M. J. Welsh** (1997) A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia. *Gene Ther* **4**: 1173-80.
88. **Fauci A. S.** (2001) Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clin Infect Dis* **32**: 675-85. Epub 2001 Feb 23.
89. **Feng H., D. Zhang, D. Palliser, P. Zhu, S. Cai, A. Schlesinger, L. Maliszewski and J. Lieberman** (2005) *Listeria*-Infected Myeloid Dendritic Cells Produce IFN- $\beta$ , Priming T Cell Activation. *J Immunol* **175**: 421-32.
90. **Ferreira G. N., G. A. Monteiro, D. M. Prazeres and J. M. Cabral** (2000) Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol* **18**: 380-8.
91. **Fischetti V. A., D. Medaglini and G. Pozzi** (1996) Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery. *Curr Opin Biotechnol* **7**: 659-66.
92. **Fischetti V. A., V. Pancholi and O. Schneewind** (1990) Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol* **4**: 1603-5.
93. **Fleeton M. N., M. Chen, P. Berglund, G. Rhodes, S. E. Parker, M. Murphy, G. J. Atkins and P. Liljestrom** (2001) Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus. *J Infect Dis* **183**: 1395-8. Epub 2001 Mar 30.

94. **Flo T. H., O. Halaas, E. Lien, L. Ryan, G. Teti, D. T. Golenbock, A. Sundan and 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**: 2064-9.
95. **Flynn J. L. and J. Chan** (2001) Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **19**: 93-129.
96. **Fogh J., W. C. Wright and J. D. Loveless** (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* **58**: 209-14.
97. **Fouts T. R., A. L. DeVico, D. Y. Onyabe, M. T. Shata, K. C. Bagley, G. K. Lewis and D. M. Hone** (2003) Progress toward the development of a bacterial vaccine vector that induces high-titer long-lived broadly neutralizing antibodies against HIV-1. *FEMS Immunol Med Microbiol* **37**: 129-34.
98. **Fouts T. R., G. K. Lewis and D. M. Hone** (1995) Construction and characterization of a *Salmonella typhi*-based human immunodeficiency virus type 1 vector vaccine. *Vaccine* **13**: 561-9.
99. **Fouts T. R., R. G. Tuskan, S. Chada, D. M. Hone and G. K. Lewis** (1995) Construction and immunogenicity of *Salmonella typhimurium* vaccine vectors that express HIV-1 gp120. *Vaccine* **13**: 1697-705.
100. **Freshney R. I.** (2000) *Culture of animal cells*. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
101. **Gaillard J. L., P. Berche, C. Frehel, E. Gouin and P. Cossart** (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**: 1127-41.
102. **Gaillard J. L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard and P. Sansonetti** (1987) In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* **55**: 2822-9.
103. **Gaillard J. L. and B. B. Finlay** (1996) Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line. *Infect Immun* **64**: 1299-308.
104. **Galen J. E. and M. M. Levine** (2001) Can a 'flawless' live vector vaccine strain be engineered? *Trends Microbiol* **9**: 372-6.
105. **Gallie D. R.** (1998) A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* **216**: 1-11.
106. **Gamvrellis A., D. Leong, J. C. Hanley, S. D. Xiang, P. Mottram and M. Plebanski** (2004) Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **82**: 506-16.
107. **Gandhi R. T. and B. D. Walker** (2002) Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med* **53**: 149-72.
108. **Geginat G., T. Nichterlein, M. Kretschmar, S. Schenk, H. Hof, M. Lalic-Multhaler, W. Goebel and A. Bubert** (1999) Enhancement of the *Listeria monocytogenes* p60-specific CD4 and CD8 T cell memory by nonpathogenic *Listeria innocua*. *J Immunol* **162**: 4781-9.
109. **Geginat G., S. Schenk, M. Skoberne, W. Goebel and H. Hof** (2001) A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* **166**: 1877-84.
110. **Georgiou G., C. Stathopoulos, P. S. Daugherty, A. R. Nayak, B. L. Iverson and R. Curtiss, 3rd** (1997) Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat Biotechnol* **15**: 29-34.
111. **Georgiou G., D. L. Stephens, C. Stathopoulos, H. L. Poetschke, J. Mendenhall and C. F. Earhart** (1996) Display of beta-lactamase on the *Escherichia coli* surface: outer membrane phenotypes conferred by Lpp'-OmpA'-beta-lactamase fusions. *Protein Eng* **9**: 239-47.
112. **Gilboa E. and J. Vieweg** (2004) Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev* **199**: 251-63.

113. **Girolomoni G., M. B. Lutz, S. Pastore, C. U. Assmann, A. Cavani and P. Ricciardi-Castagnoli** (1995) Establishment of a cell line with features of early dendritic cell precursors from fetal mouse skin. *Eur J Immunol* **25**: 2163-9.
114. **Glaser P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K. D. Entian, H. Fsihi, F. Garcia-del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L. M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. M. Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J. C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Remmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J. A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland and P. Cossart** (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-52.
115. **Gluzman Y.** (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-82.
116. **Goetz M., A. Bubert, G. Wang, I. Chico-Calero, J.-A. Vazquez-Boland, M. Beck, J. Slaghuis, A. A. Szalay and W. Goebel** (2001) Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. *P N A S USA* **98**: 12221-12226.
117. **Goldfine H. and S. J. Wadsworth** (2002) Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect* **4**: 1335-43.
118. **Goussard S., C. Grillot-Courvalin and P. Courvalin** (2003) Eukaryotic promoters can direct protein synthesis in Gram-negative bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **6**: 211-8.
119. **Grillot-Courvalin C., S. Goussard and P. Courvalin** (2002) Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. *Cell Microbiol* **4**: 177-86.
120. **Grillot-Courvalin C., S. Goussard, F. Huetz, D. M. Ojcius and P. Courvalin** (1998) Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nat Biotechnol* **16**: 862-6.
121. **Grinspoon S. K.** (2005) Metabolic syndrome and cardiovascular disease in patients with human immunodeficiency virus. *Am J Med* **118**: 23S-28S.
122. **Grode L., M. Kursar, J. Fensterle, S. H. Kaufmann and J. Hess** (2002) Cell-mediated immunity induced by recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin strains against an intracellular bacterial pathogen: importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy. *J Immunol* **168**: 1869-76.
123. **Grunberg-Manago M.** (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu Rev Genet* **33**: 193-227.
124. **Guermonez P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery and S. Amigorena** (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **20**: 621-67.
125. **Gurunathan S., D. M. Klinman and R. A. Seder** (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* **18**: 927-74.
126. **Guzman C. A., E. Domann, M. Rohde, D. Bruder, A. Darji, S. Weiss, J. Wehland, T. Chakraborty and K. N. Timmis** (1996) Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **20**: 119-26.
127. **Guzman C. A., M. Rohde, T. Chakraborty, E. Domann, M. Hudel, J. Wehland and K. N. Timmis** (1995) Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect Immun* **63**: 3665-73.
128. **Hacein-Bey-Abina S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E.**

- Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer and M. Cavazzana-Calvo** (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**: 415-9.
129. **Hajnsdorf E., F. Braun, J. Haugel-Nielsen and P. Regnier** (1995) Polyadenylation destabilizes the rpsO mRNA of *Escherichia coli*. *P N A S USA* **92**: 3973-7.
130. **Hambidge S. J. and P. Sarnow** (1991) Terminal 7-methyl-guanosine cap structure on the normally uncapped 5' noncoding region of poliovirus mRNA inhibits its translation in mammalian cells. *J Virol* **65**: 6312-5.
131. **Hambraeus G., M. Persson and B. Rutberg** (2000) The aprE leader is a determinant of extreme mRNA stability in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146**: 3051-9.
132. **Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80.
133. **Hansson M., P. Samuelson, E. Gunneriusson and S. Stahl** (2001) Surface display on gram positive bacteria. *Comb Chem High Throughput Screen* **4**: 171-84.
134. **Hansson M., S. Stahl, T. N. Nguyen, T. Bachi, A. Robert, H. Binz, A. Sjolander and M. Uhlen** (1992) Expression of recombinant proteins on the surface of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol* **174**: 4239-45.
135. **Harty J. T., L. L. Lenz and M. J. Bevan** (1996) Primary and secondary immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Curr Opin Immunol* **8**: 526-30.
136. **Hauf N., W. Goebel, F. Fiedler, Z. Sokolovic and M. Kuhn** (1997) *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF-kappaB (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation. *P N A S USA* **94**: 9394-9.
137. **Hauf N., W. Goebel, E. Serfling and M. Kuhn** (1994) *Listeria monocytogenes* infection enhances transcription factor NF-kappa B in P388D1 macrophage-like cells. *Infect Immun* **62**: 2740-7.
138. **Henderson D. A. and B. Moss** (1999) Smallpox and Vaccinia. p. 74-97. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
139. **Hennecke M., M. Kwissa, K. Metzger, A. Oumard, A. Kroger, R. Schirmbeck, J. Reimann and H. Hauser** (2001) Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *NAR* **29**: 3327-34.
140. **Hense M., E. Domann, S. Krusch, P. Wachholz, K. E. Dittmar, M. Rohde, J. Wehland, T. Chakraborty and S. Weiss** (2001) Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells. *Cell Microbiol* **3**: 599-609.
141. **Hess J. and S. H. Kaufmann** (2001) Development of live recombinant vaccine candidates against tuberculosis. *Scand J Infect Dis* **33**: 723-4.
142. **Hewson R.** (2000) RNA viruses: emerging vectors for vaccination and gene therapy. *Mol Med Today* **6**: 28-35.
143. **Hoerr I., R. Obst, H. G. Rammensee and G. Jung** (2000) In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol* **30**: 1-7.
144. **Hoiseth S. K. and B. A. Stocker** (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**: 238-9.
145. **Horton R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen and L. R. Pease** (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**: 61-8.
146. **Horwitz M. A. and G. Harth** (2003) A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* **71**: 1672-9.

147. **Huang D. and E. V. Shusta** (2005) Secretion and surface display of green fluorescent protein using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog* **21**: 349-57.
148. **Huang S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel and M. Aguet** (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* **259**: 1742-5.
149. **Huleatt J. W., I. Pilip, K. Kerksiek and E. G. Pamer** (2001) Intestinal and splenic T cell responses to enteric *Listeria monocytogenes* infection: distinct repertoires of responding CD8 T lymphocytes. *J Immunol* **166**: 4065-73.
150. **Hunziker I. P., S. Harkins, R. Feuer, C. T. Cornell and J. L. Whitton** (2004) Generation and analysis of an RNA vaccine that protects against coxsackievirus B3 challenge. *Virology* **330**: 196-208.
151. **Hyyrylainen H. L., M. Vitikainen, J. Thwaite, H. Wu, M. Sarvas, C. R. Harwood, V. P. Kontinen and K. Stephenson** (2000) D-Alanine substitution of teichoic acids as a modulator of protein folding and stability at the cytoplasmic membrane/cell wall interface of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **275**: 26696-703.
152. **Ishiguro T., M. Naito, T. Yamamoto, G. Hasegawa, F. Gejyo, M. Mitsuyama, H. Suzuki and T. Kodama** (2001) Role of macrophage scavenger receptors in response to *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Am J Pathol* **158**: 179-88.
153. **Jang S. K., H. G. Krausslich, M. J. Nicklin, G. M. Duke, A. C. Palmenberg and E. Wimmer** (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* **62**: 2636-43.
154. **Jankovic D., Z. Liu and W. C. Gause** (2001) Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* **22**: 450-7.
155. **Jensen E. R., H. Shen, F. O. Wettstein, R. Ahmed and J. F. Miller** (1997) Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle and a probe for studying cell-mediated immunity. *Immunol Rev* **158**: 147-57.
156. **Jung H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska and M. F. Kagnoff** (1995) A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* **95**: 55-65.
157. **Jung S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman and R. A. Lang** (2002) In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**: 211-20.
158. **Kaech S. M., E. J. Wherry and R. Ahmed** (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* **2**: 251-62.
159. **Karima R., S. Matsumoto, H. Higashi and K. Matsushima** (1999) The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* **5**: 123-32.
160. **Karlsson A., P. Saravia-Otten, K. Tegmark, E. Morfeldt and S. Arvidson** (2001) Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* sarA mutants due to up-regulation of extracellular proteases. *Infect Immun* **69**: 4742-8.
161. **Kaufmann S. H.** (1999) Immunity to intracellular bacteria. p. 1335-13. In W. E. Paul (ed.), *Fundamental Immunology*, 4th ed. Lippincott-Raven, New York, N. Y.
162. **Kaufmann S. H. and J. Hess** (1999) Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. *Immunol Lett* **65**: 81-4.
163. **Kaufmann S. H. and U. E. Schaible** (2002) Impfstoffentwicklung gegen Tuberkulose. *BioSpektrum* **5**: 606-611.

164. **Kayal S., A. Lilienbaum, C. Poyart, S. Memet, A. Israel and P. Berche** (1999) Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* **31**: 1709-22.
165. **Kelsall B. L. and 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**: 237-47.
166. **Kobayashi S. D., K. R. Braughton, A. R. Whitney, J. M. Voyich, T. G. Schwan, J. M. Musser and F. R. DeLeo** (2003) Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *P N A S USA* **100**: 10948-53. Epub 2003 Sep 5.
167. **Kochi S. K., K. P. Killeen and U. S. Ryan** (2003) Advances in the development of bacterial vector technology. *Expert Rev Vaccines* **2**: 31-43.
168. **Kolb-Maurer A.** (2001) *Interaktion humaner dendritischer Zellen mit Listeria monocytogenes*. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
169. **Kolb-Maurer A., I. Gentschev, H. W. Fries, F. Fiedler, E. B. Brocker, E. Kampgen and W. Goebel** (2000) *Listeria monocytogenes*-infected human dendritic cells: uptake and host cell response. *Infect Immun* **68**: 3680-8.
170. **Koren H. S., B. S. Handwerger and J. R. Wunderlich** (1975) Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J Immunol* **114**: 894-7.
171. **Kotton C. N. and E. L. Hohmann** (2004) Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. *Infect Immun* **72**: 5535-47.
172. **Koutsoumanis K. P., P. A. Kendall and J. N. Sofos** (2003) Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7514-6.
173. **Kuhn M. and W. Goebel** (1994) Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listeria* strains. *Infect Immun* **62**: 348-56.
174. **Kumar M. and G. G. Carmichael** (1998) Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1415-34.
175. **Kunst F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin and et al.** (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-56.
176. **Kursar M., K. Bonhagen, A. Kohler, T. Kamradt, S. H. Kaufmann and H. W. Mittrucker** (2004) Antigen-specific CD8(+) T cell responses in intestinal tissues during murine listeriosis. *Microbes Infect* **6**: 8-16.
177. **Kursar M., K. Bonhagen, A. Kohler, T. Kamradt, S. H. Kaufmann and H. W. Mittrucker** (2002) Organ-specific CD4+ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **168**: 6382-7.
178. **Kursar M., H. W. Mittrucker, M. Koch, A. Kohler, M. Herma and S. H. Kaufmann** (2004) Protective T cell response against intracellular pathogens in the absence of Toll-like receptor signaling via myeloid differentiation factor 88. *Int Immunol* **16**: 415-21.
179. **Laemmler U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
180. **Lanzavecchia A. and F. Sallusto** (2001) Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* **106**: 263-6.
181. **Lara-Tejero M. and E. G. Pamer** (2004) T cell responses to *Listeria monocytogenes*. *Curr Opin Microbiol* **7**: 45-50.
182. **Le Page C., J. Sanceau, J. C. Drapier and J. Wietzerbin** (1996) Differential expression of inducible NO synthase in two murine macrophage cell lines. *Immunology* **89**: 274-80.

183. **Lechardeur D. and G. L. Lukacs** (2002) Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr Gene Ther* **2**: 183-94.
184. **Lechardeur D., K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodovich and G. L. Lukacs** (1999) Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* **6**: 482-97.
185. **Lecuit M., S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner and P. Cossart** (1999) A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Embo J* **18**: 3956-63.
186. **Lecuit M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet and P. Cossart** (2001) A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* **292**: 1722-5.
187. **Lee A. H., Y. S. Suh, J. H. Sung, S. H. Yang and Y. C. Sung** (1997) Comparison of various expression plasmids for the induction of immune response by DNA immunization. *Mol Cells* **7**: 495-501.
188. **Lee J. S., K. S. Shin, J. G. Pan and C. J. Kim** (2000) Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. *Nat Biotechnol* **18**: 645-8.
189. **Lee J. W., B. Aylward, H. F. Hull, A. Batson, M. E. Birmingham and J. Lloyd** (1997) Reaping the benefits: Getting the vaccines to those who need them. p. 79-88. In M. L. Levine, G. C. Woodrow, J. B. Kaper and G. S. Cobon (eds), *New Generation Vaccines*. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.
190. **Lee W. T., G. Pasos, L. Cecchini and J. N. Mittler** (2002) Continued antigen stimulation is not required during CD4(+) T cell clonal expansion. *J Immunol* **168**: 1682-9.
191. **Leitner W. W., H. Ying and N. P. Restifo** (1999) DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine* **18**: 765-77.
192. **Letvin N. L., B. R. Bloom and S. L. Hoffman** (2001) Prospects for vaccines to protect against AIDS, tuberculosis, and malaria. *Jama* **285**: 606-11.
193. **Levine M. M. and G. Dougan** (1998) Optimism over vaccines administered via mucosal surfaces. *Lancet* **351**: 1375-6.
194. **Li L., D. G. Kang and H. J. Cha** (2004) Functional display of foreign protein on surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein. *Biotechnol Bioeng* **85**: 214-21.
195. **Li X., G. Zhang, N. Ngo, X. Zhao, S. R. Kain and C. C. Huang** (1997) Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *J Biol Chem* **272**: 28545-9.
196. **Lieberman J. and F. R. Frankel** (2002) Engineered *Listeria monocytogenes* as an AIDS vaccine. *Vaccine* **20**: 2007-10.
197. **Lin S. L., C. M. Chuong and S. Y. Ying** (2001) A Novel mRNA-cDNA interference phenomenon for silencing bcl-2 expression in human LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 639-44.
198. **Liu T., T. Matsuguchi, N. Tsuboi, T. Yajima and Y. Yoshikai** (2002) Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect Immun* **70**: 6638-45.
199. **Liu T., H. Nishimura, T. Matsuguchi and Y. Yoshikai** (2000) Differences in interleukin-12 and -15 production by dendritic cells at the early stage of *Listeria monocytogenes* infection between BALB/c and C57 BL/6 mice. *Cell Immunol* **202**: 31-40.
200. **Lodish H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. Darnell** (2000) *Molecular cell biology*. W. H. Freeman and Company, New York.
201. **Loessner H. and S. Weiss** (2004) Bacteria-mediated DNA transfer in gene therapy and vaccination. *Expert Opin Biol Ther* **4**: 157-68.
202. **Lorber B.** (1997) Listeriosis. *Clin Infect Dis* **24**: 1-9.

203. **Lowry M. A., J. I. Goldberg and M. Belosevic** (1999) Treatment of the macrophage-like P388D.1 cells with bacterial lipopolysaccharide and interferon-gamma causes long-term alterations in calcium metabolism. *Dev Comp Immunol* **23**: 253-61.
204. **Lu D., R. Benjamin, M. Kim, R. M. Conry and D. T. Curiel** (1994) Optimization of methods to achieve mRNA-mediated transfection of tumor cells in vitro and in vivo employing cationic liposome vectors. *Cancer Gene Ther* **1**: 245-52.
205. **Lundqvist A., G. Noffz, M. Pavlenko, S. Saeboe-Larsen, T. Fong, N. Maitland and P. Pisa** (2002) Nonviral and viral gene transfer into different subsets of human dendritic cells yield comparable efficiency of transfection. *J Immunother* **25**: 445-54.
206. **Lutz M. B., C. U. Assmann, G. Girolomoni and P. Ricciardi-Castagnoli** (1996) Different cytokines regulate antigen uptake and presentation of a precursor dendritic cell line. *Eur J Immunol* **26**: 586-94.
207. **Lutz M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani and G. Schuler** (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**: 77-92.
208. **Mackness G. B.** (1962) Cellular resistance to infection. *J Exp Med* **116**: 381-406.
209. **Mahoney F. J. and M. Kane** (1999) Hepatitis B Vaccine. p. 158-182. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
210. **Mandl C. W., J. H. Aberle, S. W. Aberle, H. Holzmann, S. L. Allison and F. X. Heinz** (1998) In vitro-synthesized infectious RNA as an attenuated live vaccine in a flavivirus model. *Nat Med* **4**: 1438-40.
211. **Mansell A., L. Braun, P. Cossart and L. A. O'Neill** (2000) A novel function of InlB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappaB in J774 macrophages. *Cell Microbiol* **2**: 127-36.
212. **Manthorpe M., F. Cornefert-Jensen, J. Hartikka, J. Felgner, A. Rundell, M. Margalith and V. Dwarki** (1993) Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther* **4**: 419-31.
213. **Margolin W.** (2000) Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells. *Methods* **20**: 62-72.
214. **Martinon F., S. Krishnan, G. Lenzen, R. Magne, E. Gomard, J. G. Guillet, J. P. Levy and P. Meulien** (1993) Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* **23**: 1719-22.
215. **Marzo A. L., V. Vezys, K. Williams, D. F. Tough and L. Lefrancois** (2002) Tissue-level regulation of Th1 and Th2 primary and memory CD4 T cells in response to *Listeria* infection. *J Immunol* **168**: 4504-10.
216. **McCaffrey R. L., P. Fawcett, M. O'Riordan, K. D. Lee, E. A. Havell, P. O. Brown and D. A. Portnoy** (2004) A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. *P N A S USA* **101**: 11386-91.
217. **McConkey S. J., W. H. Reece, V. S. Moorthy, D. Webster, S. Dunachie, G. Butcher, J. M. Vuola, T. J. Blanchard, P. Gothard, K. Watkins, C. M. Hannan, S. Everaere, K. Brown, K. E. Kester, J. Cummings, J. Williams, D. G. Heppner, A. Pathan, K. Flanagan, N. Arulanantham, M. T. Roberts, M. Roy, G. L. Smith, J. Schneider, T. Peto, R. E. Sinden, S. C. Gilbert and A. V. Hill** (2003) Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med* **9**: 729-35.
218. **McManus M. T. and P. A. Sharp** (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* **3**: 737-47.
219. **McShane H., A. A. Pathan, C. R. Sander, S. M. Keating, S. C. Gilbert, K. Huygen, H. A. Fletcher and A. V. Hill** (2004) Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med* **10**: 1240-4.

220. **Medaglini D., G. Pozzi, T. P. King and V. A. Fischetti** (1995) Mucosal and systemic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium *Streptococcus gordonii* after oral colonization. *P N A S USA* **92**: 6868-72.
221. **Medina E. and C. A. Guzman** (2001) Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* **19**: 1573-80.
222. **Mengaud J., H. Ohayon, P. Gounon, R. M. Mege and P. Cossart** (1996) E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**: 923-32.
223. **Mercado R., S. Vijh, S. E. Allen, K. Kerksiek, I. M. Pilip and E. G. Pamer** (2000) Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* **165**: 6833-9.
224. **Miki K., T. Nagata, T. Tanaka, Y. H. Kim, M. Uchijima, N. Ohara, S. Nakamura, M. Okada and Y. Koide** (2004) Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infect Immun* **72**: 2014-21.
225. **Mitchell D. A. and S. K. Nair** (2000) RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J Clin Invest* **106**: 1065-9.
226. **Mitchell P., D. Tollervey and J. Venema** (2000) mRNA stability in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 193-8.
227. **Moll H.** (2003) Dendritic cells and host resistance to infection. *Cell Microbiol* **5**: 493-500.
228. **Mollenkopf H., G. Dietrich and S. H. Kaufmann** (2001) Intracellular bacteria as targets and carriers for vaccination. *Biol Chem* **382**: 521-32.
229. **Moorthy V. S., M. Pinder, W. H. Reece, K. Watkins, S. Atabani, C. Hannan, K. Bojang, K. P. McAdam, J. Schneider, S. Gilbert and A. V. Hill** (2003) Safety and Immunogenicity of DNA/Modified Vaccinia Virus Ankara Malaria Vaccination in African Adults. *J Infect Dis* **188**: 1239-44.
230. **Mortimer I., P. Tam, I. MacLachlan, R. W. Graham, E. G. Saravolac and P. B. Joshi** (1999) Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther* **6**: 403-11.
231. **Mortimer Jr. E. A. and M. Wharton** (1999) Diphtheria Toxoid. p. 140-157. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
232. **Munkonge F. M., D. A. Dean, E. Hillery, U. Griesenbach and E. W. Alton** (2003) Emerging significance of plasmid DNA nuclear import in gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **55**: 749-60.
233. **Mwau M., I. Cebere, J. Sutton, P. Chikoti, N. Winstone, E. G. Wee, T. Beattie, Y. H. Chen, L. Dorrell, H. McShane, C. Schmidt, M. Brooks, S. Patel, J. Roberts, C. Conlon, S. L. Rowland-Jones, J. J. Bwayo, A. J. McMichael and T. Hanke** (2004) A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J Gen Virol* **85**: 911-9.
234. **Myers J. T., A. W. Tsang and J. A. Swanson** (2003) Localized reactive oxygen and nitrogen intermediates inhibit escape of *Listeria monocytogenes* from vacuoles in activated macrophages. *J Immunol* **171**: 5447-53.
235. **Nahm M. H., M. A. Apicella and D. E. Briles** (1999) Immunity to extracellular bacteria. p. 1373-1386. In W. E. Paul (ed.), *Fundamental Immunology*, 4th ed. Lippincott-Raven, New York, N. Y.
236. **Navarre W. W. and O. Schneewind** (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 174-229.
237. **Norton P. M., H. W. Brown, J. M. Wells, A. M. Macpherson, P. W. Wilson and R. W. Le Page** (1996) Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **14**: 167-77.
238. **Novick R. P.** (2000) Sortase: the surface protein anchoring transpeptidase and the LPXTG motif. *Trends Microbiol* **8**: 148-51.

239. **Obrig T. G., W. J. Culp, W. L. McKeehan and B. Hardesty** (1971) The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem* **246**: 174-81.
240. **O'Connell R. M., S. A. Vaidya, A. K. Perry, S. K. Saha, P. W. Dempsey and G. Cheng** (2005) Immune activation of type I IFNs by *Listeria monocytogenes* occurs independently of TLR4, TLR2, and receptor interacting protein 2 but involves TNFR-associated NF kappa B kinase-binding kinase 1. *J Immunol* **174**: 1602-7.
241. **O'Hara E. B., J. A. Chekanova, C. A. Ingle, Z. R. Kushner, E. Peters and S. R. Kushner** (1995) Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *Escherichia coli*. *P N A S USA* **92**: 1807-11.
242. **O'Riordan M., C. H. Yi, R. Gonzales, K. D. Lee and D. A. Portnoy** (2002) Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. *P N A S USA* **99**: 13861-6.
243. **Pamer E. G.** (1998) Cell-mediated immunity: the role of bacterial protein secretion. *Curr Biol* **8**: R457-60.
244. **Pamer E. G.** (2004) Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* **4**: 812-23.
245. **Paschen A., K. E. Dittmar, R. Grenningloh, M. Rohde, D. Schadendorf, E. Domann, T. Chakraborty and S. Weiss** (2000) Human dendritic cells infected by *Listeria monocytogenes*: induction of maturation, requirements for phagolysosomal escape and antigen presentation capacity. *Eur J Immunol* **30**: 3447-56.
246. **Pascual D. W., R. J. Powell, G. K. Lewis and D. M. Hone** (1997) Oral bacterial vaccine vectors for the delivery of subunit and nucleic acid vaccines to the organized lymphoid tissue of the intestine. *Behring Inst Mitt* **98**: 143-52.
247. **Pasetti M. F., R. J. Anderson, F. R. Noriega, M. M. Levine and M. B. Sztein** (1999) Attenuated deltaquaBA *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 915 as a live vector utilizing prokaryotic or eukaryotic expression systems to deliver foreign antigens and elicit immune responses. *Clin Immunol* **92**: 76-89.
248. **Pasetti M. F., M. M. Levine and M. B. Sztein** (2003) Animal models paving the way for clinical trials of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi live oral vaccines and live vectors. *Vaccine* **21**: 401-18.
249. **Paterson Y.** (2003) Rational approaches to immune regulation. *Immunol Res* **27**: 451-62.
250. **Paterson Y. and R. S. Johnson** (2004) Progress towards the use of *Listeria monocytogenes* as a live bacterial vaccine vector for the delivery of HIV antigens. *Expert Rev Vaccines* **3**: S119-34.
251. **Peters C., E. Domann, A. Darbouche, T. Chakraborty and M. E. Mielke** (2003) Tailoring host immune responses to *Listeria* by manipulation of virulence genes -- the interface between innate and acquired immunity. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 243-53.
252. **Peters C., X. Peng, D. Douven, Z. K. Pan and Y. Paterson** (2003) The induction of HIV Gag-specific CD8+ T cells in the spleen and gut-associated lymphoid tissue by parenteral or mucosal immunization with recombinant *Listeria monocytogenes* HIV Gag. *J Immunol* **170**: 5176-87.
253. **Piard J. C., I. Hautefort, V. A. Fischetti, S. D. Ehrlich, M. Fons and A. Gruss** (1997) Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol* **179**: 3068-72.
254. **Pilgrim S.** (2002) *Entwicklung eines "DNA Delivery" Systems auf der Basis Virulenz-attenuierter Listerien*. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
255. **Pilgrim S., J. Stritzker, C. Schoen, A. Kolb-Maurer, G. Geginat, M. J. Loessner, I. Gentshev and W. Goebel** (2003) Bactofection of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: improvement and mechanism of DNA delivery. *Gene Ther* **10**: 2036-45.
256. **Plotkin S. A.** (1999) Rubella vaccine. p. 409-440. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
257. **Plotkin S. A., A. Murdin and E. Vidor** (1999) Inactivated Polio Vaccine. p. 345-363. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.

258. **Plotkin S. A. and M. Wharton** (1999) Mumps Vaccine. p. 267-292. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
259. **Pollard H., J. S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J. P. Behr and D. Escande** (1998) Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* **273**: 7507-11.
260. **Pollard H., G. Toumaniantz, J. L. Amos, H. Avet-Loiseau, G. Guihard, J. P. Behr and D. Escande** (2001) Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids. *J Gene Med* **3**: 153-64.
261. **Polo J. M. and T. W. Dubensky, Jr.** (2002) Virus-based vectors for human vaccine applications. *Drug Discov Today* **7**: 719-27.
262. **Ponsaerts P., V. F. Van Tendeloo and Z. N. Berneman** (2003) Cancer immunotherapy using RNA-loaded dendritic cells. *Clin Exp Immunol* **134**: 378-84.
263. **Pope C., S. K. Kim, A. Marzo, D. Masopust, K. Williams, J. Jiang, H. Shen and L. Lefrancois** (2001) Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **166**: 3402-9.
264. **Portnoy D. A., V. Auerbuch and I. J. Glomski** (2002) The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol* **158**: 409-14. Epub 2002 Aug 5.
265. **Pouton C. W.** (1998) Nuclear import of polypeptides, polynucleotides and supramolecular complexes. *Adv Drug Deliv Rev* **34**: 51-64.
266. **Pozzi G., M. Contorni, M. R. Oggioni, R. Manganelli, M. Tommasino, F. Cavalieri and V. A. Fischetti** (1992) Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci. *Infect Immun* **60**: 1902-7.
267. **Prasher D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast and M. J. Cormier** (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-33.
268. **Preiss T. and M. W. Hentze** (1998) Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature* **392**: 516-20.
269. **Pron B., C. Boumaila, F. Jaubert, P. Berche, G. Milon, F. Geissmann and J. L. Gaillard** (2001) Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell Microbiol* **3**: 331-40.
270. **Pron B., C. Boumaila, F. Jaubert, S. Sarnacki, J. P. Monnet, P. Berche and J. L. Gaillard** (1998) Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect Immun* **66**: 747-55.
271. **Qiu P., P. Ziegelhoffer, J. Sun and N. S. Yang** (1996) Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. *Gene Ther* **3**: 262-8.
272. **Ralph P., M. A. Moore and K. Nilsson** (1976) Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med* **143**: 1528-33.
273. **Rauhut R. and G. Klug** (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 353-70.
274. **Rayner J. O., S. A. Dryga and K. I. Kamrud** (2002) Alphavirus vectors and vaccination. *Rev Med Virol* **12**: 279-96.
275. **Redd S. C., L. E. Markowitz and S. L. Katz** (1999) Measles vaccine. p. 222-266. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
276. **Reis e Sousa C., A. Sher and P. Kaye** (1999) The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr Opin Immunol* **11**: 392-9.

277. **Ritter T., C. Brandt, S. Prosch, A. Vergopoulos, K. Vogt, J. Kolls and H. D. Volk** (2000) Stimulatory and inhibitory action of cytokines on the regulation of hCMV-IE promoter activity in human endothelial cells. *Cytokine* **12**: 1163-70.
278. **Rock K. L. and A. L. Goldberg** (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* **17**: 739-79.
279. **Rodriguez A., A. Regnault, M. Kleijmeer, P. Ricciardi-Castagnoli and S. Amigorena** (1999) Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* **1**: 362-8.
280. **Rogers H. W., M. P. Callery, B. Deck and E. R. Unanue** (1996) *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J Immunol* **156**: 679-84.
281. **Rose F., S. A. Zeller, T. Chakraborty, E. Domann, T. Machleidt, M. Kronke, W. Seeger, F. Grimminger and U. Sibelius** (2001) Human endothelial cell activation and mediator release in response to *Listeria monocytogenes* virulence factors. *Infect Immun* **69**: 897-905.
282. **Rousset M.** (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* **68**: 1035-40.
283. **Rueckert R. R.** (1996) *Picornaviridae*: The viruses and their replication. p. 609-654. In B. N. F. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanok, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman and S. E. Straus (eds), *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia.
284. **Rush C., T. Mitchell and P. Garside** (2002) Efficient priming of CD4+ and CD8+ T cells by DNA vaccination depends on appropriate targeting of sufficient levels of immunologically relevant antigen to appropriate processing pathways. *J Immunol* **169**: 4951-60.
285. **Sachs J. D. and A. Spielman** (eds.) (2001) *The economics of malaria*. World Health Organization, Genf.
286. **Saenz-Badillos J., S. P. Amin and R. D. Granstein** (2001) RNA as a tumor vaccine: a review of the literature. *Exp Dermatol* **10**: 143-54.
287. **Sambandamurthy V. K. and W. R. Jacobs, Jr.** (2005) Live attenuated mutants of *Mycobacterium tuberculosis* as candidate vaccines against tuberculosis. *Microbes Infect* **20**: 20.
288. **Samuelson P., E. Gunneriusson, P. A. Nygren and S. Stahl** (2002) Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol* **96**: 129-54.
289. **Samuelson P., M. Hansson, N. Ahlberg, C. Andreoni, F. Gotz, T. Bachi, T. N. Nguyen, H. Binz, M. Uhlen and S. Stahl** (1995) Cell surface display of recombinant proteins on *Staphylococcus carnosus*. *J Bacteriol* **177**: 1470-6.
290. **Santiago-Machuca A. E., F. Ruiz-Perez, J. S. Delgado-Dominguez, I. Becker, A. Isibasi and C. R. Gonzalez-Bonilla** (2002) Attenuated *Salmonella enterica* serovar *typhi* live vector with inducible chromosomal expression of the T7 RNA polymerase and its evaluation with reporter genes. *Plasmid* **47**: 108-19.
291. **Schmid I., W. J. Krall, C. H. Uittenbogaart, J. Braun and J. V. Giorgi** (1992) Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* **13**: 204-8.
292. **Schneider R. J. and I. Mohr** (2003) Translation initiation and viral tricks. *TIBS* **28**: 130-6.
293. **Schoen C., J. Stritzker, W. Goebel and S. Pilgrim** (2004) Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int J Med Microbiol* **294**: 319-35.
294. **Schuller S., S. Kugler and W. Goebel** (1998) Suppression of major histocompatibility complex class I and class II gene expression in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **20**: 289-99.
295. **Schwan W. R. and W. Goebel** (1994) Host cell responses to *Listeria monocytogenes* infection include differential transcription of host stress genes involved in signal transduction. *P N A S USA* **91**: 6428-32.

296. **Schwan W. R., S. Kugler, S. Schuller, D. J. Kopecko and W. Goebel** (1996) Detection and characterization by differential PCR of host eukaryotic cell genes differentially transcribed following uptake of intracellular bacteria. *Infect Immun* **64**: 91-9.
297. **Sharp J. S. and D. H. Bechhofer** (2003) Effect of Translational Signals on mRNA Decay in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 5372-5379.
298. **Shedlock D. J. and D. B. Weiner** (2000) DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol* **68**: 793-806.
299. **Shedlock D. J., J. K. Whitmire, J. Tan, A. S. MacDonald, R. Ahmed and H. Shen** (2003) Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **170**: 2053-63.
300. **Shen H., M. K. Slifka, M. Matloubian, E. R. Jensen, R. Ahmed and J. F. Miller** (1995) Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle for the induction of protective anti-viral cell-mediated immunity. *P N A S USA* **92**: 3987-91.
301. **Shen Y., M. Naujokas, M. Park and K. Ireton** (2000) InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**: 501-10.
302. **Shi H. and W. Wen Su** (2001) Display of green fluorescent protein on *Escherichia coli* cell surface. *Enzyme Microb Technol* **28**: 25-34.
303. **Shoji I., H. Aizaki, H. Tani, K. Ishii, T. Chiba, I. Saito, T. Miyamura and Y. Matsuura** (1997) Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J Gen Virol* **78**: 2657-64.
304. **Sibeliuss U., E. C. Schulz, F. Rose, K. Hattar, T. Jacobs, S. Weiss, T. Chakraborty, W. Seeger and F. Grimminger** (1999) Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infect Immun* **67**: 1125-30.
305. **Simon M. M., L. Gern, P. Hauser, W. Zhong, P. J. Nielsen, M. D. Kramer, C. Brenner and R. Wallich** (1996) Protective immunization with plasmid DNA containing the outer surface lipoprotein A gene of *Borrelia burgdorferi* is independent of an eukaryotic promoter. *Eur J Immunol* **26**: 2831-40.
306. **Sizemore D. R., A. A. Branstrom and J. C. Sadoff** (1995) Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* **270**: 299-302.
307. **Smith K. C. and J. R. Starke** (1999) Bacille Calmette-Guérin Vaccine. p. 111-139. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
308. **Somers D. G., M. L. Pearson and C. J. Ingles** (1975) Isolation and characterization of an alpha-amanitin-resistant rat myoblast mutant cell line possessing alpha-amanitin-resistant RNA polymerase II. *J Biol Chem* **250**: 4825-31.
309. **Spreng S., G. Dietrich, S. Niewiesk, V. ter Meulen, I. Gentschev and W. Goebel** (2000) Novel bacterial systems for the delivery of recombinant protein or DNA. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**: 299-304.
310. **Starks H., K. W. Bruhn, H. Shen, R. A. Barry, T. W. Dubensky, D. Brockstedt, D. J. Hinrichs, D. E. Higgins, J. F. Miller, M. Giedlin and H. G. Bower** (2004) *Listeria monocytogenes* as a vaccine vector: virulence attenuation or existing antivector immunity does not diminish therapeutic efficacy. *J Immunol* **173**: 420-7.
311. **Stathopoulos C., G. Georgiou and C. F. Earhart** (1996) Characterization of *Escherichia coli* expressing an Lpp'OmpA(46-159)-PhoA fusion protein localized in the outer membrane. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**: 112-9.
312. **Stephenson K. and C. R. Harwood** (1998) Influence of a cell-wall-associated protease on production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2875-81.

313. **Stephenson K., C. L. Jensen, S. T. Jorgensen, J. H. Lakey and C. R. Harwood** (2000) The influence of secretory-protein charge on late stages of secretion from the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Biochem J* **350**: 31-9.
314. **Stevens R., K. E. Howard, S. Nordone, M. Burkhard and G. A. Dean** (2004) Oral Immunization with recombinant *Listeria monocytogenes* controls virus load after vaginal challenge with feline immunodeficiency virus. *J Virol* **78**: 8210-8.
315. **Stevens R., A. Lavoy, S. Nordone, M. Burkhard and G. A. Dean** (2005) Pre-existing immunity to pathogenic *Listeria monocytogenes* does not prevent induction of immune responses to feline immunodeficiency virus by a novel recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine. *Vaccine* **23**: 1479-90.
316. **STIKO** (2004) Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert-Koch-Institut. *Epidemiologische Bulletin des Robert-Koch-Institutes* **30**: 235-250.
317. **Stockinger S., B. Reutterer, B. Schaljo, C. Schellack, S. Brunner, T. Materna, M. Yamamoto, S. Akira, T. Taniguchi, P. J. Murray, M. Muller and T. Decker** (2004) IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism. *J Immunol* **173**: 7416-25.
318. **Stritzker J., J. Janda, C. Schoen, M. Taupp, S. Pilgrim, I. Gentschev, P. Schreier, G. Geginat and W. Goebel** (2004) Growth, virulence, and immunogenicity of *Listeria monocytogenes* aro mutants. *Infect Immun* **72**: 5622-9.
319. **Stritzker J., C. Schoen and W. Goebel** (2005) Enhanced synthesis of internalin A in aro mutants of *Listeria monocytogenes* indicates posttranscriptional control of the inlAB mRNA. *J Bacteriol* **187**: 2836-45.
320. **Strobel I., S. Berchtold, A. Gotze, U. Schulze, G. Schuler and A. Steinkasserer** (2000) Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. *Gene Ther* **7**: 2028-35.
321. **Studier F. W. and B. A. Moffatt** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-30.
322. **Sullivan M. A., R. E. Yasbin and F. E. Young** (1984) New shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments. *Gene* **29**: 21-6.
323. **Sun J. C. and M. J. Bevan** (2003) Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**: 339-42.
324. **Sung R. S., L. Qin and J. S. Bromberg** (2001) TNFalpha and IFNgamma induced by innate anti-adenoviral immune responses inhibit adenovirus-mediated transgene expression. *Mol Ther* **3**: 757-67.
325. **Sutter R. W., S. L. Cochi and J. L. Melnick** (1999) Live Attenuated Poliovirus Vaccines. p. 364-408. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
326. **Suzue K., T. Asai, T. Takeuchi and S. Koyasu** (2003) In vivo role of IFN-gamma produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. *Eur J Immunol* **33**: 2666-75.
327. **Szalay G., J. Hess and S. H. Kaufmann** (1995) Restricted replication of *Listeria monocytogenes* in a gamma interferon-activated murine hepatocyte line. *Infect Immun* **63**: 3187-95.
328. **Tabor S. and C. C. Richardson** (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *P N A S USA* **82**: 1074-8.
329. **Tachibana R., H. Harashima, Y. Shinohara and H. Kiwada** (2001) Quantitative studies on the nuclear transport of plasmid DNA and gene expression employing nonviral vectors. *Adv Drug Deliv Rev* **52**: 219-26.
330. **Tam M. A. and M. J. Wick** (2004) Dendritic cells and immunity to *Listeria*: TipDCs are a new recruit. *Trends Immunol* **25**: 335-9.

331. **Thomas C. A., Y. Li, T. Kodama, H. Suzuki, S. C. Silverstein and J. El Khoury** (2000) Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J Exp Med* **191**: 147-56.
332. **Thwaite J. E., L. W. Baillie, N. M. Carter, K. Stephenson, M. Rees, C. R. Harwood and P. T. Emmerson** (2002) Optimization of the cell wall microenvironment allows increased production of recombinant *Bacillus anthracis* protective antigen from *B. subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 227-34.
333. **Timmons L., D. L. Court and A. Fire** (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**: 103-12.
334. **Timmons L. and A. Fire** (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**: 854.
335. **Torres D., M. Barrier, F. Bihl, V. J. Quesniaux, I. Maillet, S. Akira, B. Ryffel and F. Erard** (2004) Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* **72**: 2131-9.
336. **Towbin H., T. Staehelin and J. Gordon** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *P N A S USA* **76**: 4350-4.
337. **Tseng W. C., F. R. Haselton and T. D. Giorgio** (1999) Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta* **1445**: 53-64.
338. **Tsien R. Y.** (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509-44.
339. **Tzfira T., Y. Rhee, M. H. Chen, T. Kunik and V. Citovsky** (2000) Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annu Rev Microbiol* **54**: 187-219.
340. **Unanue E. R.** (1997) Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr Opin Immunol* **9**: 35-43.
341. **Underhill D. M. and A. Ozinsky** (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* **14**: 103-10.
342. **Valenti P., R. Greco, G. Pitari, P. Rossi, M. Ajello, G. Melino and G. Antonini** (1999) Apoptosis of Caco-2 intestinal cells invaded by *Listeria monocytogenes*: protective effect of lactoferrin. *Exp Cell Res* **250**: 197-202.
343. **van Loon F. P., J. D. Clemens, J. Chakraborty, M. R. Rao, B. A. Kay, D. A. Sack, M. Yunus, M. Ali, A. M. Svennerholm and J. Holmgren** (1996) Field trial of inactivated oral cholera vaccines in Bangladesh: results from 5 years of follow-up. *Vaccine* **14**: 162-6.
344. **Van Tendeloo V. F., H. W. Snoeck, F. Lardon, G. L. Vanham, G. Nijs, M. Lenjou, L. Hendriks, C. Van Broeckhoven, A. Moulijn, I. Rodrigus, P. Verdonk, D. R. Van Bockstaele and Z. N. Berneman** (1998) Nonviral transfection of distinct types of human dendritic cells: high-efficiency gene transfer by electroporation into hematopoietic progenitor- but not monocyte-derived dendritic cells. *Gene Ther* **5**: 700-7.
345. **van Wely K. H., J. Swaving, R. Freudl and A. J. Driessen** (2001) Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 437-54.
346. **Vazquez-Boland J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland and J. Kreft** (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**: 584-640.
347. **Vecino W. H., N. M. Quanquin, L. Martinez-Sobrido, A. Fernandez-Sesma, A. Garcia-Sastre, W. R. Jacobs, Jr. and G. J. Fennelly** (2004) Mucosal immunization with attenuated *Shigella flexneri* harboring an influenza hemagglutinin DNA vaccine protects mice against a lethal influenza challenge. *Virology* **325**: 192-9.
348. **Vignuzzi M., S. Gerbaud, S. van der Werf and N. Escriou** (2001) Naked RNA immunization with replicons derived from poliovirus and Semliki Forest virus genomes for the generation of a cytotoxic T cell response against the influenza A virus nucleoprotein. *J Gen Virol* **82**: 1737-47.

349. **Wain-Hobson S.** (1989) HIV genome variability in vivo. *Aids* **3**: S13-8.
350. **Wang Z., P. J. Troilo, X. Wang, T. G. Griffiths, S. J. Pacchione, A. B. Barnum, L. B. Harper, C. J. Pauley, Z. Niu, L. Denisova, T. T. Follmer, G. Rizzuto, G. Ciliberto, E. Fattori, N. L. Monica, S. Manam and B. J. Ledwith** (2004) Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther* **11**: 711-21.
351. **Ward J. I. and K. M. Zangwill** (1999) *Haemophilus influenzae* Vaccines. p. 183-221. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
352. **Ward S. M., R. W. Tindle, A. A. Khromykh and E. J. Gowans** (2003) Generation of CTL responses using Kunjin replicon RNA. *Immunol Cell Biol* **81**: 73-8.
353. **Wassilak S. G. F., W. A. Orenstein and R. W. Sutter** (1999) Tetanus Toxoid. p. 441-474. In S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds), *Vaccines*, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
354. **Webster D. and A. V. Hill** (2003) Progress with new malaria vaccines. *Bull World Health Organ* **81**: 902-9. Epub 2004 Mar 1.
355. **Wells J. M., P. W. Wilson, P. M. Norton, M. J. Gasson and R. W. Le Page** (1993) *Lactococcus lactis* high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol Microbiol* **8**: 1155-62.
356. **Wenger R. H., H. Moreau and P. J. Nielsen** (1994) A comparison of different promoter, enhancer, and cell type combinations in transient transfections. *Anal Biochem* **221**: 416-8.
357. **Wernerus H. and S. Stahl** (2004) Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol Appl Biochem* **40**: 209-28.
358. **Whittaker G. R., M. Kann and A. Helenius** (2000) Viral entry into the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 627-51.
359. **WHO** (1980) *The global eradication of smallpox. Final report of the global commission for the certification of smallpox eradication.* World Health Organization, Genf.
360. **WHO** (2003) Progress towards global eradication of poliomyelitis. *Weekly Epidemiological Record* **78**: 138-144.
361. **WHO** (2003) *The World Health Report 2003: Shaping the Future.* World Health Organization, Genf.
362. **Wiethoff C. M. and C. R. Middaugh** (2003) Barriers to nonviral gene delivery. *J Pharm Sci* **92**: 203-17.
363. **Wilke M., E. Fortunati, M. van den Broek, A. T. Hoogeveen and B. J. Scholte** (1996) Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Ther* **3**: 1133-42.
364. **Wing E. J. and S. H. Gregory** (2002) *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *J Infect Dis* **185**: S18-24.
365. **Wolff J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani and P. L. Felgner** (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**: 1465-8.
366. **Wong P. and E. G. Pamer** (2003) Feedback regulation of pathogen-specific T cell priming. *Immunity* **18**: 499-511.
367. **Wood S., N. Maroushek and C. J. Czuprynski** (1993) Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infect Immun* **61**: 3068-72.
368. **Wu S. C., J. C. Yeung, Y. Duan, R. Ye, S. J. Szarka, H. R. Habibi and S. L. Wong** (2002) Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3261-9.
369. **Xeros N.** (1962) Deoxyriboside control and synchronization of mitosis. *Nature* **194**: 682-3.
370. **Xu F. and S. N. Cohen** (1995) RNA degradation in *Escherichia coli* regulated by 3' adenylation and 5' phosphorylation. *Nature* **374**: 180-3.

371. **Yanisch-Perron C., J. Vieira and J. Messing** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
372. **Yoshinaga T., K. Yasuda, Y. Ogawa and Y. Takakura** (2002) Efficient uptake and rapid degradation of plasmid DNA by murine dendritic cells via a specific mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **299**: 389-94.
373. **Yu Y. A., S. Shabahang, T. M. Timiryasova, Q. Zhang, R. Beltz, I. Gentshev, W. Goebel and A. A. Szalay** (2004) Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat Biotechnol* **22**: 313-20.
374. **Zabner J., A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger and M. J. Welsh** (1995) Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* **270**: 18997-9007.
375. **Zhang G., V. Gurtu and S. R. Kain** (1996) An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **227**: 707-11.
376. **Zhou W. Z., D. S. Hoon, S. K. Huang, S. Fujii, K. Hashimoto, R. Morishita and Y. Kaneda** (1999) RNA melanoma vaccine: induction of antitumor immunity by human glycoprotein 100 mRNA immunization. *Hum Gene Ther* **10**: 2719-24.

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ap	Ampicillin
BHI	<i>brain heart infusion</i> , Hirn-Herz-Bouillon
<i>bla</i>	Gen für $\beta$ -Lactamase
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation antigen</i>
CDS	kodierende Sequenz
CFU	<i>colony forming unit</i> , Kolonie-bildende Einheiten
Cm	Chloramphenicol
CMV	Zytomegalievirus
CTL	zytotoxische T-Zelle
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
DC	dendritische Zelle(n)
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Em	Erythromycin
EMCV	Encephalomyocarditisvirus
ENH	<i>enhancer</i>
ER	enoplasmatisches Retikulum
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IFN- $\gamma$	$\gamma$ -Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KE	Kletteinheiten
Km	Kanamycin

<i>lacZ</i>	Gen für $\alpha$ -Galaktosidase
M $\Phi$	Makrophage(n)
mAb	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MOI	“multiplicity of infection”
MQ-H <sub>2</sub> O	Millipore-Wasser
<i>ori</i>	Replikationsursprung
P	Promotor
<i>p.i.</i>	“ <i>post infectionem</i> ”, nach Infektion
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfon-säure)
poly A	Polyadenylierungssignal
PRR	Pattern recognition receptor
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SD	Shine-Dalgarno-Sequenz
SD/SA	<i>Splice donor/ splice acceptor site</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
Sv	Serovar
SV40	Simian Virus 40
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tc	Tetracyclin
TH	T-Helferzelle
TLR	Toll like receptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxyethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TrpS	Tryptophanyl-tRNA-Synthetase
<i>trpS</i>	Gen für Tryptophanyl-tRNA-Synthetase
U	<i>units</i> , Einheiten
VT	Volumenteil
WT	Wildtyp
<i>x'</i>	Resistenz gegen x

## 8.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum	15.02.1970
Geburtsort	Gunzenhausen
Nationalität	Deutsch

### Schulbildung

1976 bis 1980	Stephani-Grundschule Gunzenhausen
1980 bis Juni 1989	Simon-Marius-Gymnasium Gunzenhausen, Abitur mit Gesamtnote „ <i>sehr gut</i> “ (1,2)

### Medizinische Ausbildung

Okt. 1992 bis März 1998	Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen, Physikum Oktober 1994 mit Gesamtnote „ <i>gut</i> “ (1,66), Staatsexamen I September 1995 mit Gesamtnote „ <i>gut</i> “, Staatsexamen II April 1998 mit Gesamtnote „ <i>gut</i> “ (1,66)
April 1998 bis März 1999	Praktisches Jahr am Diakoniekrankenhaus Bremen, Staatsexamen III April 1999 mit Gesamtnote „ <i>sehr gut</i> “, Ärztliche Prüfung mit Gesamtnote „ <i>sehr gut</i> “ (1,49)
Okt. 1997 bis Jan. 2000	Promotion (Dr. med.) in Medizinischer Mikrobiologie bei Prof. Dr. R. Rüchel am Hygiene-Institut der Georg-August-Universität Göttingen, Promotionskolloquium im November 2000 mit der Gesamtnote „ <i>sehr gut</i> “
Juli 1999 bis Dez. 1999	AiP in der Klinik für Allgemein- und Gefäßchirurgie am Zentralkrankenhaus St.-Jürgen-Straße in Bremen
Jan. 2000 bis Dez. 2000	Fortsetzung des AiP in der Inneren Medizin / Infektiologie (Station Schottmüller) an der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Jan. 2001	Ärztliche Approbation
seit August 2004	Wissenschaftlicher Assistent (C1) am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg

### Naturwissenschaftliche Ausbildung

Okt. 1989 bis März 1992	Grund- und Hauptstudium der Diplomphysik an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Vordiplom im Mai 1991 mit der Gesamtnote „ <i>sehr gut</i> “ (0,9)
April 1992 bis Okt. 1995	Hauptstudium Diplomphysik an der Georg-August-Universität in Göttingen
Jan. 2002 bis Dez. 2002	Aufbaustudium Bioinformatik an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (AfW), Abschluss im Juni 2003 mit der Gesamtnote „ <i>gut</i> “

Jan. 2001 bis Juli 2004                      Promotion (Dr. rer. nat.) im Rahmen eines MD/PhD-Stipendiums am Lehrstuhl für Mikrobiologie bei Prof. Dr. W. Goebel an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

### 8.3 Publikationsliste

#### Originalarbeiten

1. Schoen C., U. Reichard, M. Monod, H. D. Kratzin und R. Rüchel (2002) Molecular cloning of an extracellular aspartic proteinase from *Rhizopus microsporus* and evidence for its expression during infection. *Med Mycol* **40**: 61-71.
2. Pilgrim S., J. Stritzker, C. Schoen, A. Kolb-Mäurer, G. Geginat, M. J. Loessner, I. Gentschev und W. Goebel (2003) Bactofection of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: improvement and mechanism of DNA delivery. *Gene Ther* **10**: 2036-45.
3. Stritzker J., J. Janda, C. Schoen, M. Taupp, S. Pilgrim, I. Gentschev, P. Schreier, G. Geginat und W. Goebel (2004) Growth, virulence, and immunogenicity of *Listeria monocytogenes aro* mutants. *Infect Immun* **72**: 5622-9.
4. Stritzker J., C. Schoen und W. Goebel (2005) Enhanced synthesis of internalin A in *aro* mutants of *Listeria monocytogenes* indicates posttranscriptional control of the *inlAB* mRNA. *J Bacteriol* **187**: 2836-45.
5. Schoen C., A. Kolb-Mäurer, G. Geginat, D. Löffler, B. Bergmann, J. Stritzker, A. Szalay, S. Pilgrim und W. Goebel (2005) Bacterial delivery of functional messenger RNA to mammalian cells. *Cell Microbiol* **7**: 709-724.
6. Pilgrim S., C. Schoen, J. Stritzke, A. Frenzen, D. Löffler, I. Gentschev und W. Goebel (2005) Virulence-attenuated intracellular bacterial pathogens for the development of novel live vaccines. *Nova Acta Leopoldina* **NF 92**: 235-240.

#### Klinische Fallberichte

7. Frantz S., A. Greiner, C. Schoen, P. Langmann und H. Klinker (2002) A sebaceous tumor in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Eur J Med Res* **7**: 135-7.

#### Übersichtsartikel und Kongressberichte

8. Schoen C. (2002) Von Menschen und Läusen: Leopoldina International Symposium „Parasitism, Commensalism, Symbiosis - Common Themes, Different Outcome“. *BIOSpektrum* **6**: 733.
9. Schoen C., J. Stritzker, W. Goebel und S. Pilgrim (2004) Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization *Int J Med Microbiol* **294**: 319-335.

#### Poster

1. Pilgrim S., J. Stritzker, C. Schoen, A. Kolb-Mäurer, I. Gentschev und W. Goebel. Development of an improved DNA-delivery system using *Listeria monocytogenes* as carrier. *Strategies for Immune Therapy*, Würzburg, 16. bis 18. Januar 2002.

2. Stritzker J., J. Janda, C. Schoen, S. Pilgrim, G. Geginat, I. Gentshev und W. Goebel. Listerial deletion mutants in the aromatic aminoacid pathway and their applications as vaccines and DNA-delivery vectors. *Strategies for Immune Therapy*, 2<sup>nd</sup> International Conference, Würzburg, 29. Februar bis 3. März 2004.
3. Schoen C., A. Kolb-Mäurer, G. Geginat, D. Löffler, B. Bergman, J. Stritzker, S. Pilgrim und W. Goebe. RNA delivery to mammalian cells with *Listeria monocytogenes*. Leopoldina International Symposium *Threat of Infection. Microbes of high Pathogenic Potential – Strategies for Detection, Control and Eradication*, Würzburg, 25. bis 28. Juli 2004.
4. Löffler D., C. Schoen, G. Geginat, W. Goebel und S. Pilgrim. Delivery of DNA, RNA and protein antigens by *Listeria monocytogenes*. *ISOPOL XV. XV International Symposium on Problems of Listeriosis*, Uppsala, 12. bis 15. September 2004.

### **Vorträge**

1. *RNA delivery to mammalian cells with Listeria monocytogenes and its potential use for vaccine development*. Progress Meeting of the DFG Priority Programme “Novel Vaccination Strategies”, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin, 20. bis 21. April 2004.
2. *Virulenzattenuierte intrazelluläre Bakterien als Träger genetischer Vakzine*. Symposium zur 5. Sitzung des Wissenschaftlichen Beirates, Biozentrum, Würzburg, 13. bis 15. Oktober 2004.
3. *RNA delivery to mammalian cells with Listeria monocytogenes and its application to vaccine development*. University of Agricultural Sciences, Department of Fishery Microbiology, Mangalore, Indien, 13. Januar 2005.

### **Patentbeteiligung**

1. Prof. Dr. W. Goebel, Dr. S. Pilgrim, J. Stritzker, PD Dr. I. Gentshev, Dr. Ch. Schoen. Bakterielle Träger für Nukleotidsequenzen kodierend für Wirkstoffe. Deutsche Patentanmeldung DE 103 26 189.3.